



TESIS DOCTORAL

Estudio y manejo de comunidades
microbianas de lodos de alpechín en
balsas de evaporación para su
biorremediación y aprovechamiento

María Rosa Martínez Gallardo
Diciembre 2021



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y
BIOPROCESOS INDUSTRIALES APLICADOS A LA
AGROALIMENTACIÓN Y MEDIOAMBIENTE

**“ESTUDIO Y MANEJO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE
LADOS DE ALPECHÍN EN BALSAS DE EVAPORACIÓN PARA
SU BIORREMEDIACIÓN Y APROVECHAMIENTO”**

María Rosa Martínez Gallardo

Tesis Doctoral. Almería, diciembre 2021

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y
BIOPROCESOS INDUSTRIALES APLICADOS A LA
AGROALIMENTACIÓN Y MEDIOAMBIENTE

**“ESTUDIO Y MANEJO DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE
LODOS DE ALPECHÍN EN BALSAS DE EVAPORACIÓN PARA
SU BIORREMEDIACIÓN Y APROVECHAMIENTO”**

**“STUDY AND MANIPULATION OF MICROBIAL COMMUNITIES
OF OLIVE MILL WASTEWATER SLUDGE FROM
EVAPORATION PONDS FOR BIOREMEDIATION AND
VALORIZATION”**

MEMORIA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR

Fdo.: María Rosa Martínez Gallardo

Fdo.: María José López López
Profesora Titular de Universidad
Universidad de Almería

Fdo.: Macarena del Mar Jurado Rodríguez
Profesora Ayudante Doctora
Universidad de Almería

LA PRESENTE TESIS INCLUYE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO EUROPEO DE INVESTIGACIÓN “RECLAMATION OF OLIVE OIL WASTE ABANDONED LAGOONS USING BIO-RECOVERING STRATEGIES IN A CIRCULAR ECONOMY SCENARIO” FINANCIADO POR EL INSTRUMENTO FINANCIERO LIFE DE LA COMISIÓN EUROPEA (LIFE16 ENV/ES/000331 LIFE+ REGROW).



Agradecimientos

Cuando era pequeña nunca me conformaba con las tajantes respuestas “porque sí” o “porque no”, lo cual me destinaba a una regañina mayor. Con el tiempo fui alimentando esa obsesión por entender las preguntas y descubrir sus respuestas. Me topé de bruces con la ciencia. La ciencia que se estudia en el colegio e instituto consiguió captar toda mi atención y me ayudó a descubrir muchas respuestas, entre ellas la de mi formación académica. La pasión por la ciencia fue el barco que me permitió navegar por el mundo de la biotecnología, para finalmente desembarcar en este maravilloso puerto donde soy feliz día a día, la Microbiología. Cómo expuso una gran científica y amiga, la finalización de la tesis doctoral no es más que el principio de lo que espero sea una vida dedicada a la ciencia y, especialmente, a la Microbiología.

Tras terminar los estudios de grado y máster en biotecnología, tuve la suerte de ser aceptada como beneficiaria de un contrato de apoyo a la investigación en la Universidad de Almería. Mi amor por la Microbiología y la sinceridad me sirvieron de aliadas para acabar sentada delante de mi querido Joaquín Moreno Casco, Catedrático de Microbiología e, inicialmente, el director de mi presente Tesis Doctoral hasta su triste y desolador fallecimiento hace aproximadamente un año. Joaquín conseguía dejarme totalmente embelesada al conocer la respuesta a todas mis preguntas y, además, explicármelas de la forma más sencilla y entendible posible. Gracias Joaquín, por confiar en mí y por permitirme formar parte del grupo de investigación BIO-175, que con tanta ilusión y esfuerzo creaste. Gracias por hacer mi sueño posible, siempre te llevaré en mi corazón.

Todos tenemos una madre biológica, aunque hablar de esto en una Tesis científica es algo peliagudo. Una madre que nos abre las puertas a este mundo y nos permite acceder a él. En el mundo de la Ciencia suele existir también una persona que se convierte en tu referente. María José López López ha sido la mía, mi madre científica. Ella ha sido mi microscopio óptico, la que me ayuda a ver con más precisión el mundo de la Microbiología. Mariajo, gracias por dejarme ser tu pupila y por impulsar mis inquietudes científicas. Todo lo que sé y lo que soy te lo debo a ti. Gracias y mil gracias.

Quiero agradecerle a la profesora Francisca Suárez, mi querida Paqui, su apoyo incondicional en los buenos, y no tan buenos momentos. Por muy nublado que esté el día

ella consigue hacerme reír con su risa contagiosa. Es un orgullo trabajar con una persona tan excelente, personal y laboralmente.

Me gustaría hacer especial mención para la codirectora de la presente Tesis Doctoral, Macarena del Mar Jurado Rodríguez. Mi ejemplo a seguir día a día y una gran amiga. Otro maravilloso regalo que me da la ciencia. Gracias por estar ahí.

A mis compañeros de trabajo y amantes de la cerveza fresca los viernes por la tarde, gracias por hacer de mis penas alegrías. Jesús, no te imaginas lo feliz que me hace saber que todas mis locas ganas de investigar te las pude transmitir un día y que, desde entonces, no te hayas separado de mi lado. Eres un gran investigador y un buen amigo. Juan, gran docente y amigo, gracias por hacerme reír y por apreciarme tanto. Creo que tienes una preciosa capacidad para transmitir tus conocimientos a los alumnos digna de admirar. Ana Toribio, para los compañeros “Ana T”, gracias por tus consejos y tu cariño. No te imaginas lo que me ha ayudado tu actitud positiva, eres mi arcoíris. Rosi, amiga y compañera, gracias por confiar en mí y por no dejarme nunca sola.

Quiero agradecerle a mi compañera y también amiga, María José Estrella, también conocida como Junior, la ayuda que me ha aportado en mis nuevos comienzos. Gracias por preocuparte tanto por mí. También quiero agradecer a mi compañera Ana Siles su ayuda en las labores de investigación y su gran compañía en los viajes a Mora (Toledo). Gracias por tus consejos durante las interminables charlas en el coche.

Quiero agradecer al Dr Raúl Moral, Catedrático de Edafología y Química Agrícola de la Universidad Miguel Hernández, su colaboración y apoyo en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. También agradecer al Dr. José Sáez su constante predisposición para ayudarme. La toma de muestras en las balsas de evaporación de alpechín en Mora se hacía amena y divertida contigo. Agradecer también la colaboración de Mercedes, José María Penco y David Jorquera, y a todo el equipo del Ayuntamiento de Mora por su valiosa ayuda en las tareas desarrolladas en las balsas. Gracias por los buenos momentos de risas y diversión que nos concedíamos después de las largas jornadas de trabajo. Mi participación en el proyecto Life+Regrow me ha concedido la suerte de conocer excelentes personas como vosotros.

A mis amigas, Alicia, Ángela, Alba y Laura, gracias por escucharme y permitirme divulgar la ciencia. Los amigos son la familia que se elige. Gracias por elegirme a mí.

A mis padres, Antonio y Mari, gracias por apoyarme en esta apasionante aventura científica y por confiar siempre en mí. No me alcanza la vida para agradecer todo lo que hacéis por mí. Os quiero con toda el alma.

A mi hermana, Marga, mi reflejo, el regalo más bonito que me dieron mis padres, gracias por ser mi confidente y por no dejarme flaquear nunca. Eres muy importante para mí. Te quiero.

A mi ángel del cielo, mi amada abuela Margarita, no he conocido nunca un alma tan pura como la tuya. Me voy a acordar de ti todos los días de mi vida. Siempre ensayaba contigo mis presentaciones y, a pesar de que no entendías de lo que hablaba, me mirabas con ese brillo en los ojos de orgullo y amor. Te voy a querer siempre abuela.

A mi esposo, Diego, nunca pensé encontrar una persona tan buena y que me quisiese tanto como tú. Gracias por ayudarme a mejorar. No todo es color de rosa en esta vida y, por desgracia, nos han tocado vivir algunos momentos grises. Pero juntos somos más fuertes y vamos a superarlo todo. Te quiero mucho cariño.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. Indicadores de calidad	1
II. Resumen	2
III. Abstract	5
IV. Introducción	8
1. Residuos de la extracción del aceite de oliva: el alpechín	8
1.1. Residuos de la extracción del aceite de oliva: tipos	9
1.2. Composición y características del alpechín	13
1.3. Gestión del alpechín y problemática asociada: las balsas de evaporación	17
2. Tratamientos biológicos: biorremediación y aprovechamiento	23
2.1. Definición y aspectos básicos	24
2.2. Estrategias de biorremediación <i>in situ</i>	29
2.2.1. <i>Landfarming</i>	29
2.2.2. <i>Fitorremediación</i>	31
2.2.3. <i>Compostaje</i>	35
2.2.4. <i>Vermicompostaje</i>	38
2.3. Bioaumentación: inoculantes para biorremediación	42
3. Tratamiento de alpechín: alternativas sostenibles para su valorización	45
Referencias	50
V. Hipótesis y objetivos	65
VI. Fases experimentales	67
VII. Resultados	70
Capítulo 1. Estudio del estado inicial del área contaminada por alpechín	71
1. Introduction	74
2. Material and Methods	75
2.1. <i>Study area and sampling</i>	75
2.2. <i>Analytical methods</i>	77
2.2.1. Chemical and physicochemical analysis	77
2.2.2. Phytotoxicity and ecotoxicity analysis	77
2.2.3. Microbial analysis: counts, taxonomic and functional biodiversity	78
2.2.4. Respiration indices and microbial biomass carbon	79
2.3. <i>Bioinformatics and data analysis</i>	80
3. Results and discussion	81
3.1. <i>Characteristics of OMW sludges</i>	81
3.1.1. Physicochemical parameters	81

3.1.2. Toxicity	82
3.1.3. Microbial load, biodiversity, and metabolic activity	84
3.1.4. Relationship between parameters	89
3.2. <i>Impact of OMW sludge in soil depth</i>	91
4. Conclusions	93
5. References	94
Capítulo 2. Selección de inoculantes para la biorremediación de lodos de alpechín y validación de su eficacia	97
1. Introduction	101
2. Material and methods	103
2.1. <i>Description of study area and sampling</i>	103
2.2. <i>Selection and characterization of inoculum for bioaugmentation</i>	104
2.2.1. Counts of total and polyphenol-degrading microorganisms in ponds	104
2.2.2. Isolation and selection of OMW-degrading microorganisms	104
2.2.3. Identification of isolates	106
2.2.4. Characterization of inoculum for bioaugmentation	107
2.2.5. Production of inoculum for bioaugmentation	107
2.3. <i>Composting experiments in pond</i>	107
2.4. <i>Analytical techniques</i>	108
2.5. <i>Statistical analysis</i>	110
3. Results and discussion	110
3.1. <i>Selection and characterization of inoculum consortia for bioaugmentation</i>	110
3.2. <i>OMW ponds bioremediation through composting: bioaugmentation with fungal consortium</i>	117
4. Conclusions	121
5. References	122
Capítulo 3. Estudio en profundidad de compostaje y vermicompostaje	127
1. Introduction	130
2. Material and methods	132
2.1 <i>Description of the study area and sampling</i>	132
2.2 <i>Bioremediation strategies</i>	133
2.3 <i>Analytical methods</i>	134
2.4 <i>Statistical analysis</i>	137
3. Results and discussion	137
3.1 <i>Enhancement of OMWS biodegradability</i>	137
3.2 <i>Thermal composting profile</i>	138

3.3 <i>Evolution of physico-chemical and chemical properties of (vermi) composting</i>	141
3.4 <i>Evolution of the phenolic compounds and OMWS toxicity</i>	144
3.5 <i>Earthworm population dynamics</i>	148
3.6 <i>Quality and agronomic value of final products</i>	149
4. Conclusions	150
5. References	151
Capítulo 4. Estudio comparativo de estrategias de biorremediación de lodos de alpechín	157
1. Introduction	161
2. Material and methods	162
2.1. <i>Study area and start-up</i>	162
2.2. <i>Development of bio-treatments and sampling</i>	163
2.3. <i>Analytical</i>	164
2.4. <i>Data analysis</i>	165
3. Results and discussion	165
3.1. <i>Evolution of chemical fractions and biomass carbon</i>	165
3.2. <i>Study and functionality of microbial community in each bio-treatment</i>	170
3.3. <i>Characterization of final material after biological treatments</i>	174
4. Conclusion	177
5. Appendix A. Supplementary Material	178
6. References	179
VIII. Discusión	184
IX. Conclusiones	203

I. Indicadores de calidad

La presente Tesis Doctoral integra los siguientes artículos que han sido publicados en revistas científicas indexadas:

- **Martínez-Gallardo, M.R.**, López, M.J., López-González, J.A., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F, Pérez-Murcia, M.D., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J., 2021. **Microbial communities of the olive mill wastewater sludge stored in evaporation ponds: The resource for sustainable bioremediation.** J. Environ. Manage. 279, 111810.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports©, 2019): **6,789**

Categoría JCR: Environmental Sciences

Cuartil en su categoría: **Q1**

- **Martínez-Gallardo, M.R.**, López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J., 2020. **Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation.** Sci. Total Environ. 703, 135537.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports©, 2019): **7,963**

Categoría JCR: Environmental Sciences

Cuartil en su categoría: **Q1**

- Sáez, J.A., Pérez-Murcia, M.D., Vico, A., **Martínez-Gallardo, M.R.**, Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., Bustamante, M.A., Sánchez-Hernández, J.C., Moreno, J., Moral, R., 2021. **Olive mill wastewater-evaporation ponds long term stored: Integrated assessment of in situ bioremediation strategies based on composting and vermicomposting.** J. Hazard. Mater. 402, 123481.

Calidad de la revista

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports©, 2019): **10,588**

Categoría JCR: Environmental Sciences

Cuartil en su categoría: **Q1**

II. Resumen

El método más comúnmente utilizado desde la década de los 80 para la gestión del alpechín, residuo líquido de la industria de extracción del aceite de oliva, ha estado limitado a su acúmulo en balsas de evaporación. En estas instalaciones al aire libre, el agua se evapora y el alpechín se concentra formando un material con una consistencia de lodo. En estas condiciones, los componentes recalcitrantes del alpechín como los compuestos fenólicos, que le confieren carácter fitotóxico y antimicrobiano, también se concentran y modifican durante el almacenaje. La mayoría de balsas de evaporación inicialmente construidas estaban mal dimensionadas y presentaban una deficiente impermeabilización, por lo que las sustancias contaminantes se extendían a los suelos y masas de agua colindantes. A pesar de que muchas de estas instalaciones están actualmente en desuso, debido a que se han adoptado nuevos métodos de extracción de aceite que no generan alpechín, el impacto de las balsas persiste, así como la necesidad de implementar métodos para el tratamiento de los lodos de alpechín acumulados en las mismas.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue el estudio de tratamientos de biorremediación *in situ* como alternativa sostenible para la gestión de lodos o sedimentos resultantes del acúmulo de alpechín en balsas de evaporación. Este trabajo se desarrolló en un complejo de 8 balsas de evaporación localizadas en el municipio de Mora (Toledo) que ocupa 5 ha y que no se emplea para la disposición del alpechín desde 2006. Se desarrollaron tres fases experimentales, incluyendo, la caracterización de los lodos contenidos en las balsas y la determinación de la extensión de la contaminación en suelos adyacentes, seguido de la búsqueda y selección de microorganismos a emplear en las técnicas de biorremediación, y culminando con la implementación *in situ* de cuatro estrategias de biorremediación (landfarming, fitorremediación, compostaje y vermicompostaje), cada una de las cuales se desarrolló en dos modalidades, inoculado o no con los microorganismos previamente seleccionados. Finalmente, se realizó una comparativa de las estrategias de biorremediación aplicadas para discernir cuál de ellas podía considerarse más destacable o ventajosa en el tratamiento de los lodos de alpechín. Estos experimentos dieron como resultado la publicación de tres artículos en revistas indexadas que integran esta Tesis Doctoral y un cuarto trabajo enviado para publicación que se recoge junto con los tres anteriores en la Sección VII. Resultados de esta Memoria.

La caracterización de los lodos de alpechín y de la microbiota que alberga, puso de manifiesto la existencia de diferencias entre lodos procedentes de distintas balsas, derivadas, principalmente, de la antigüedad de la balsa y de su historial de llenado-vaciado determinado por la configuración del complejo de balsas conectadas entre sí. De acuerdo con ello, las balsas más antiguas y desecadas contenían lodos con un reducido contenido en materia orgánica; mientras que este fue elevado en lodos de balsas más

recientes o más cercanas al punto de descarga de alpechín. Por ello, con vistas a la implementación de las técnicas de biorremediación, se valoró la necesidad de mezclar ambos tipos de lodo, además de incorporar residuos orgánicos frescos (excrementos de animales y compost agotado de setas), disponibles en el entorno cercano a las balsas, como agentes bioestimulantes para balancear los nutrientes necesarios y activar la funcionalidad de la microbiota residente, cuya presencia, diversidad y actividades metabólicas fue validada. Además, los análisis de ecotoxicidad y fitotoxicidad, realizados en los suelos subyacentes a la balsa en la que se implementarían las técnicas de biorremediación, revelaron que la contaminación se encontraba limitada a la capa de lodo (0-45 cm) sin que se observase un impacto significativo en la capa de suelo subyacente (45-90 cm), por lo que se concluyó que no se requería excavación profunda de esta capa para el desarrollo de las operaciones de biorremediación en la propia balsa. Estos resultados se recogen en el Capítulo 1 de esta Memoria.

El análisis de la microbiota de los lodos puso de manifiesto la existencia de una elevada proporción de microorganismos degradadores de polifenoles adaptados a las condiciones extremas impuestas por la matriz de lodo concentrada, con una elevada conductividad eléctrica y pH y reducida actividad de agua, entre otros. Con el objeto de seleccionar microorganismos para bioaumentar las estrategias de biorremediación, se desarrolló un programa de búsqueda de microorganismos con actividades enzimáticas polifenoloxidasas y ligninolíticas entre los aislados obtenidos a partir de los lodos mediante procedimientos selectivos. Se obtuvo una colección constituida por 20 hongos y 40 bacterias, entre los cuales dos hongos, identificados como *Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16, tuvieron un amplio espectro de actividades enzimáticas y fueron capaces de degradar completamente el compuesto fenólico tirosol en cultivo mixto. Ambos hongos fueron seleccionados para constituir el consorcio fúngico que se emplearía en las estrategias de biorremediación para eliminar los contaminantes más recalcitrantes de los lodos de alpechín. Además, su idoneidad para tal fin fue validada mediante un ensayo preliminar, en el que se incorporaron en pilas de compostaje con lodos de alpechín, demostrando ser efectivos en la reducción o eliminación de la fitotoxicidad y ecotoxicidad de los lodos en comparación con los niveles para ambos parámetros en pilas de compostaje no inoculadas. Estos resultados se recogen en el Capítulo 2 de esta memoria.

Finalmente, en una de las balsas se implementaron las cuatro estrategias de biorremediación en sus dos modalidades cada una, bioaumentadas o no con el consorcio seleccionado. Para todos los casos, basado en los análisis realizados en la primera fase del estudio, los lodos orgánicos e inorgánicos se mezclaron entre sí y con residuos orgánicos frescos en proporciones adecuadas para balancear nutrientes y alcanzar una relación C/N de 25. Esta matriz se dispuso en 8 subparcelas dentro de la balsa, en forma de pilas para el compostaje y primera fase de vermicompostaje, y formando una capa

plana para landfarming y fitorremediación. En esta última se sembraron 4 especies de plantas (*Juncus acutus*, *Chrysopogon zizanioides*, *Claudium mariscus* and *Phragmites australis*). Tras la disposición del material para cada pareja de estrategias, se inoculó una de ellas con biomasa del consorcio fúngico, se ajustaron las operaciones de manejo correspondientes a cada caso y se realizaron muestreos cada dos meses durante un período total de 9 meses. Los análisis revelaron que todas las estrategias redujeron significativamente la fitotoxicidad y ecotoxicidad de los lodos de alpechín, siendo casi completamente eliminadas en las modalidades inoculadas. Aunque el landfarming y la fitorremediación contribuyeron a mejorar las características de los lodos como sustrato, el compostaje y el compostaje seguido de vermicompostaje tras la fase bio-oxidativa resultaron ser las técnicas más idóneas para generar sustratos de calidad para su uso agrícola y valorizar de este modo el lodo de alpechín. Para validar esto último, se realizó un estudio en profundidad del desarrollo de los procesos de compostaje y vermicompostaje, así como de los productos obtenidos. Este análisis reveló que el perfil térmico fue adecuado y que el compost y el vermicompost obtenidos presentaban una elevada calidad agronómica, reuniendo el último unas mejores características en comparación con el primero. De hecho, con vistas a una restauración integral del área afectada se propuso un modelo en cascada en el que los lodos, principalmente los de mayor carga orgánica, se tratarían en primera instancia mediante compostaje hasta la fase bio-oxidativa seguido de vermicompostaje, para generar sustratos idóneos para una posterior fitorremediación o restauración vegetal. En el caso de los lodos con menor carga orgánica, los tratamientos de landfarming y fitorremediación serían los de elección, aunque también pueden rendir productos mediante compostaje o vermicompostaje. Estos resultados se recogen en los Capítulos 3 y 4 de esta Memoria.

En términos generales, el uso de estrategias biológicas como landfarming, fitorremediación, compostaje y vermicompostaje, permiten gestionar los lodos de alpechín remanentes en balsas de evaporación de manera sostenible económica y ecológicamente, además de revalorizar estos residuos dando lugar a productos de interés comercial en el marco de la economía circular.

III. Abstract

The most commonly used method since the 1980s for the management of olive mill wastewater (OMW), the liquid waste from the olive oil extraction industry, has been limited to its accumulation in evaporation ponds. In these outdoor facilities, the water evaporates, and the OMW concentrates and becomes a muddy material. Under these conditions, recalcitrant components of OMW, such as phenolic compounds, which are responsible for their phytotoxicity and antimicrobial effect, are also concentrated and modified during storage. Most of the evaporation ponds initially built were poorly dimensioned and waterproofed, so the pollutants spread to the adjacent soils and water bodies. Even though many of these facilities are currently in disuse, due to the adoption of new olive oil extraction methods that do not generate OMW, the impact of the ponds persists, as well as the need to implement techniques for the treatment of OMW sludge accumulated in them.

The main objective of this Doctoral Thesis was the study of in situ bioremediation treatments as a sustainable alternative for the management of sludge or sediments resulting from the accumulation of OMW in evaporation ponds. This work was developed in a disposal facility made up of eight evaporation ponds located in the municipality of Mora (Toledo) that occupies 5 ha and has not been used for the disposal of OMW since 2006. Three experimental phases were developed, including the characterization of the sludge contained in the ponds and the determination of the extent of contamination in adjacent soils; followed by the search and selection of microorganisms to be used in bioremediation techniques; and culminating in the in situ implementation of four bioremediation strategies (landfarming, phytoremediation, composting and vermicomposting), each of which was developed in two modalities, inoculated or not with the previously selected microorganisms. Finally, a comparison of the bioremediation strategies was made to discern which of them could be considered more remarkable or advantageous in the treatment of OMW sludge. These experiments resulted in the publication of three articles in indexed journals that make up this Doctoral Thesis and a fourth work sent for publication that is collected together with the previous three in Section VII. Results of this document.

The characterization of the OMW sludge and the microbiota it harbors revealed the existence of differences between sludge from different ponds, derived mainly from the age of the pond and its filling-emptying history determined by the configuration of the complex of interconnected ponds. Accordingly, the oldest and most dried-up ponds contained sludge with a low organic matter content, whereas this was higher in sludge from more recent ponds or closer to the point of discharge of OMW. Therefore, with a view to the implementation of bioremediation techniques, the need to mix both types of sludge was considered. In addition, fresh organic waste (animal excrement and spent

mushroom compost), available near the ponds, was added as biostimulants, to balance the necessary nutrients and activate the activity of the resident microbiota, whose presence, diversity, and metabolic functionalities were validated. Moreover, the analysis of ecotoxicity and phytotoxicity of the soils underlying the pond in which the bioremediation techniques would be implemented, revealed that the contamination was limited to the layer of mud (0-45 cm) without observing a significant impact on the underlying soil layer (45-90 cm). Accordingly, it was concluded that deep excavation of this layer was not required for the development of bioremediation operations in the pond itself. These results are collected in Chapter 1 of this document.

The analysis of the microbiota of the sludge revealed the existence of a high proportion of polyphenol-degrading microorganisms adapted to the extreme conditions imposed by the concentrated mud matrix, with high electrical conductivity and pH and low water activity, among others. In order to select microorganisms to bio-augment bioremediation strategies, a search program for microorganisms with polyphenoloxidase and ligninolytic enzymatic activities was developed among isolates obtained from the sludge through selective procedures. A collection consisting of 20 fungi and 40 bacteria was obtained, among which, two fungi, identified as *Aspergillus ochraceus* H2 and *Scedosporium apiospermum* H16, had a wide spectrum of enzymatic activities and were able to completely degrade the polyphenol tyrosol in mixed culture. Both fungi were selected to constitute the fungal consortium that would be used in the bioremediation strategies to eliminate the most recalcitrant contaminants from the OMW sludge. In addition, their suitability for this purpose was validated by a preliminary test, in which they were incorporated into composting piles with OMW sludge, proving to be effective in reducing or eliminating the phytotoxicity and ecotoxicity of the sludge compared to the levels for both parameters in non-inoculated compost piles. These results are collected in Chapter 2 of this document.

Finally, in one of the ponds, the four bioremediation strategies were implemented in their two modalities, bio-augmented or not with the selected fungal consortium. For all cases, based on the analysis carried out in the first phase of the study, the organic and inorganic sludge were mixed and added of fresh organic waste in adequate proportions to balance nutrients and achieve a C / N ratio of 25. This matrix was arranged in 8 subplots within the pond, in the form of piles for composting and first phase of vermicomposting, and forming a flat layer for landfarming and phytoremediation. In the latter, 4 species of plants were sown (*Juncus acutus*, *Chrysopogon zizanioides*, *Claudium mariscus* and *Phragmites australis*). After disposing of the material for each strategy, one of them was inoculated with biomass from the fungal consortium, the handling operations corresponding to each case were adjusted, and samplings were carried out every two months for a total period of 9 months. The analysis revealed that all the strategies significantly reduced the phytotoxicity and ecotoxicity of the vegetable water sludge,

being almost eliminated in the inoculated modalities. Although landfarming and phytoremediation contributed to improving the characteristics of the sludge as a substrate, composting and composting followed by vermicomposting after the bio-oxidative phase turned out to be the most suitable techniques to generate quality substrates for agricultural use and valorize the OMW sludge. To validate the latter, an in-depth study was carried out on the development of the composting and vermicomposting processes, as well as the products obtained. This analysis revealed that the thermal profile was adequate and that the compost and vermicompost obtained had a high agronomic quality, the latter having better characteristics compared to the former. In fact, with a view to a comprehensive restoration of the affected area, a cascade model was proposed in which the sludge, mainly those with the highest organic load, would be treated in the first instance by composting until the bio-oxidative phase followed by vermicomposting, to generate suitable substrates for subsequent phytoremediation or plant restoration. In the case of sludge with less organic load, landfarming and phytoremediation treatments would be the ones of choice, although they can also yield products by composting or vermicomposting. These results are collected in Chapters 3 and 4 of this document.

In general terms, the use of biological strategies such as landfarming, phytoremediation, composting and vermicomposting, allows managing the OMW sludge in evaporation ponds in an economically and ecologically sustainable way, in addition to valorizing these residues, giving rise to products of commercial interest in the circular economy framework.

IV. Introducción

1. Residuos de la extracción del aceite de oliva: el alpechín

El aceite de oliva es un producto muy demandado mundialmente debido a sus propiedades organolépticas y beneficios para la salud. Su producción y consumo ha protagonizado un incremento de grandes magnitudes en las últimas décadas (Fig. 1), desde la obtención de alrededor de $1,4 \times 10^6$ toneladas (Tm) de aceite de oliva en la campaña 1990/1991, hasta $3,1 \times 10^6$ Tm en 2018/2019 (IOC, 2021). La previsión a nivel global de generación de aceite de oliva para la presente campaña 2020/2021 gira en torno a $3,2 \times 10^6$ Tm. Aproximadamente, el 75% de dicha producción procede de los países europeos situados en la cuenca mediterránea (IOC, 2021). La industria del aceite de oliva en estos países tiene un fuerte arraigo tradicional que actualmente, además, cuenta con una importante repercusión económica (Roig et al., 2005). Alrededor de unas 12.000 almazaras se encuentran actualmente funcionando en los países de la cuenca mediterránea (Banias et al., 2016), entre ellos, España se encuentra en la cumbre de la producción de aceite de oliva, como primera potencia mundial en el sector oleícola, seguido de Grecia e Italia, generando en la campaña 2018/2019 alrededor de $1,7 \times 10^6$ Tm, $0,18 \times 10^6$ Tm y $0,17 \times 10^6$ Tm, respectivamente (IOC, 2021).

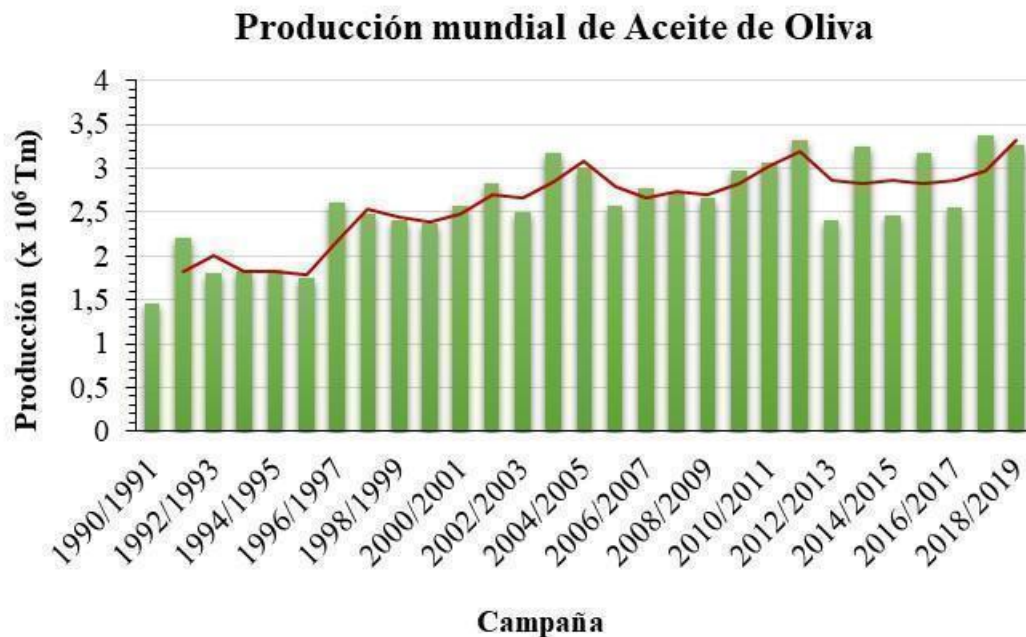


Figura 1. Producción mundial de aceite de oliva por campaña, desde 1990 hasta la actualidad, expresada en el orden de 10^6 toneladas (IOC, 2021).

Todas estas cifras llevan aparejada la expectativa futura de un incremento constante del consumo de aceite de oliva, no sólo en los países mediterráneos originarios, sino a nivel mundial. Esta tendencia, ascendente en su consumo, deriva de la aceptación general de los beneficios que implica este producto para la salud, como son la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares o diferentes tipos de cáncer, o la modificación de respuestas inflamatorias y autoinmunes, entre otras (Justino et al., 2011). La incesante demanda de aceite de oliva implica un gran aumento de su producción, lo cual supone una ventaja económica para los países líderes en su comercialización. Sin embargo, durante la producción de aceite de oliva no sólo se produce aceite, sino que también tiene lugar la generación de grandes cantidades de residuos. La gestión y manejo de dichos residuos procedentes de la industria olivarera despiertan una gran preocupación social, especialmente por el impacto ambiental que ocasionan.

1.1. Residuos de la extracción del aceite de oliva: tipos

Para la extracción del aceite a partir de la aceituna se suceden varias fases secuenciales que incluyen: lavado de las aceitunas, molturación y batido de la pasta, extracción, separación y, finalmente, lavado del aceite producido (Roig et al., 2006). Una vez recogidas las aceitunas, estas se transportan hasta las almazaras donde se separan de las hojas y ramas y se lavan. Después se colocan en el molino donde se someten a trituración hasta formar una masa que se bate para ayudar a que las pequeñas gotas de aceite se fusionen y acumulen aglomeradas, facilitando así la posterior separación de las fases de aceite y agua. Finalmente se obtiene una pasta constituida por aceite, pequeños trozos de hueso, agua y restos celulares de los frutos molturados (Souilem et al., 2017; López, 1996). En este punto, para la extracción y separación del aceite, existen dos métodos: el prensado tradicional (sistema de extracción clásico), empleado durante muchos siglos con leves modificaciones aplicadas a lo largo del tiempo; y la centrifugación, que ha sido adoptado en la industria oleícola en las últimas décadas. Actualmente existen dos sistemas de centrifugación denominados: sistema de extracción continuo de tres fases (o trifásico) y sistema de extracción continuo de dos fases (o bifásico), cuyas diferencias se ilustran en la Figura 2 (Kapellakis et al., 2008; Roig et al., 2006).

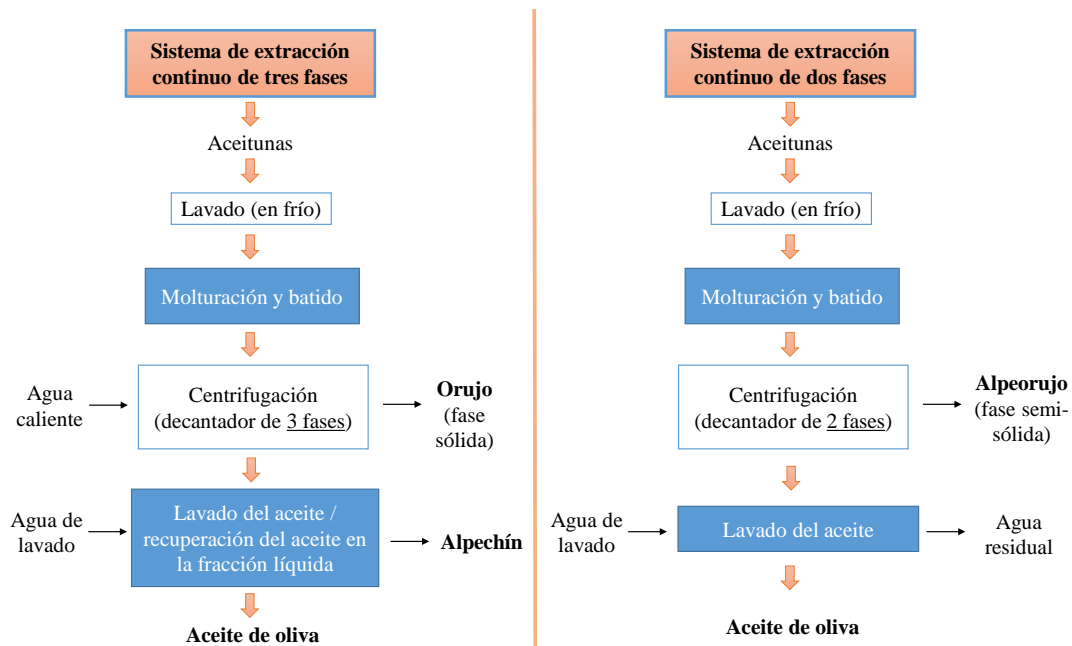


Figura 2. Sistemas de extracción continuos de dos y tres fases (Albuquerque et al., 2004).

Durante el prensado tradicional, tras la molienda, la pasta de aceituna se extiende en discos de fibra o capachos que se apilan unos sobre otros y se colocan en la prensa. Se aplica presión sobre los discos para compactar la fase sólida de la pasta de aceituna y percolar las fases líquidas (aceite y agua de vegetación), lo que se facilita mediante la incorporación de una pequeña cantidad de agua. El prensado genera una fracción sólida, denominada orujo, que contiene pulpa de aceituna, piel, hueso y agua, y una emulsión que contiene las aguas residuales de las almazaras o alpechín y el aceite de oliva, el cual se separa del alpechín por decantación. Aunque en la década de 1970, razones económicas y de rendimiento obligaron a las almazaras a abandonar progresivamente este método algunos productores de aceite de oliva lo siguen utilizando. El tradicional proceso de prensado discontinuo dio paso, inicialmente, al proceso de centrifugación continuo que utiliza un sistema trifásico, y más tarde a un sistema bifásico (Souilem et al., 2017; Dermeche et al., 2013; López, 1996).

El sistema de extracción continuo de aceite de oliva utiliza un decantador para separar las fases por centrifugación. Se basa en las diferencias de densidad de los componentes de la pasta de aceituna (aceite de oliva, agua y sólidos insolubles) (Souilem et al., 2017; Demicheli y Bontoux, 1977). El sistema trifásico genera al final del proceso

3 fracciones: el orujo (fase sólida) y dos fracciones líquidas, el aceite de oliva (fase hidrofóbica) y el alpechín (fase hidrófila). Este sistema presenta ventajas respecto al tradicional, como son la automatización completa, continuidad del proceso, mayor calidad del aceite y menor superficie necesaria. Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes como el mayor consumo de agua y de energía, la mayor producción de residuo líquido (alpechín) y el mayor gasto económico por el uso de instalaciones más sofisticadas (Souilem et al., 2017; Roig et al., 2006; Vlyssides et al., 2004; López, 1996).

El alpechín generado a partir de los sistemas de extracción trifásico y tradicional, han sido frecuentemente gestionado de forma inadecuada mediante su vertido en suelos, arroyos o ríos cercanos a las almazaras. El vertido continuo de estos residuos, así como el aumento de su generación, derivado de la mayor producción de aceite de oliva en los últimos años por su gran demanda, han provocado graves problemas medioambientales especialmente derivados de la contaminación de aguas superficiales. Para aplacar y reducir dichas consecuencias, se procedió al desarrollo legislativo de una serie de normativas que obligaban a las almazaras a gestionar o eliminar sus residuos (Doula et al., 2017). Concretamente, en 1981 el gobierno español adoptó un marco legal (Real Decreto 3499/81 del 4 de Diciembre) para prohibir el vertido de alpechín sin tratar en aguas superficiales y subvencionó la construcción de unas 1000 balsas o estanques para su almacenamiento durante el periodo de molienda, con el objetivo de favorecer su evaporación durante el cálido verano mediterráneo (Kapellakis et al., 2008; Doulas et al., 2017). El resultado de esta iniciativa fue la mejora de la calidad de las aguas superficiales cercanas a las almazaras. Este método de gestión fue uno de los más aceptados en los países mediterráneos y propició, más recientemente, el desarrollo de plantas o instalaciones específicas para el tratamiento de estas aguas residuales. Sin embargo, dichas instalaciones no se consolidaron en el sector del aceite de oliva por razones técnicas y económicas (Roig et al., 2006; Doula et al., 2017). Durante la década de los años 90 se llevó a cabo un cambio del sistema de extracción continuo trifásico al bifásico, dando lugar a la obtención de un nuevo residuo semisólido denominado alpeorujo, que supone una combinación de la fase líquida hidrófila, alpechín, y la fase sólida, orujo, obtenidas en el sistema que le precedía, el trifásico. Los sistemas bifásicos han sido denominados decantadores "ecológicos" por la reducción del consumo de agua (hasta un 75% menos) (Tabla 1). En la actualidad, más del 90% de las almazaras trabajan con el sistema bifásico (Kapellakis et al., 2008; Doula et al., 2017). Sin embargo, este cambio

no ocurrió en muchos países, debido probablemente a las dificultades de gestión que surgieron con el alpeorajo cuyas propiedades físico-químicas dificultaban la extracción del aceite de orujo obtenido tradicionalmente a partir de este (Dermeche et al., 2013). De hecho, en Europa, además de España, sólo Croacia tiene una alta proporción de almazaras con sistemas bifásicos. Estos problemas convierten al alpeorajo en un residuo que requiere también de un eficiente tratamiento que minimice los riesgos ambientales que se le asocian (Roig et al., 2006).

Tabla 1. Datos aproximados de flujos de entrada - salida para los tres procesos principales de extracción de aceite de oliva (Azbar et al., 2004; Caputo et al., 2003).

Procesos de producción	Entrada	Salida
Tradicional	Olivas = 1 Ton Agua de lavado = 0,1-0,12 m ³ Energía = 40-60 kWh	Aceite ≈ 200 kg Residuo sólido = 200-400 kg Aguas residuales = 400-600 kg
Sistema continuo trifásico	Olivas = 1 Ton Agua de lavado = 0,1-0,12 m ³ Agua decantador = 0,5-1 m ³ Agua para impurezas = 10 L Energía = 90-117 kWh	Aceite = 200 kg Residuo sólido = 500-600 kg Aguas residuales = 1.000-1.200 kg
Sistema continuo bifásico	Olivas = 1 Ton Agua de lavado = 0,1-0,12 m ³ Energía = 90-117 kWh	Aceite = 200 kg Residuo sólido = 800-950 kg Aguas residuales = 85-110 kg

Otro método viable de extracción de aceite de oliva es el proceso continuo, combinado de percolación-centrifugación conocido como Sinolea (Vekiari et al., 2002; Dermeche et al., 2013). En lugar de presión y centrifugación, este método utiliza la filtración selectiva combinada con la centrifugación para separar el aceite de la pasta de aceituna. Sin embargo, este proceso no se aplica de forma generalizada debido a sus elevados costes operativos y de mantenimiento y a la gran demanda de energía. Además, no es completamente eficiente, ya que deja una gran cantidad de aceite todavía en la pasta de aceituna. Por lo tanto, la pasta de aceituna restante (residuo del método Sinolea) tiene que ser procesada utilizando el método moderno estándar (decantador industrial) para aumentar el rendimiento del aceite (Dermeche et al., 2013).

1.2. Composición y características del alpechín

El alpechín es un líquido turbio con un olor fuerte y desagradable que puede presentar desde un color rojo oscuro hasta negro. Los integrantes mayoritarios son los compuestos hidrosolubles de las aceitunas, ligeramente modificados respecto a los que presentan los frutos, debido a los procesos físicos de extracción empleados durante su procesado. Además, contiene sustancias lipófilas (aceite) y material particulado (pulpa de los frutos, huesos triturados, etc.). Estos componentes se encuentran disueltos, en suspensión o emulsión formando una mezcla relativamente estable (López et al., 1996). Su composición varía tanto cualitativa como cuantitativamente según la variedad de aceituna, las condiciones climáticas, las prácticas de cultivo, el tiempo de almacenamiento de las aceitunas y el proceso de extracción del aceite de oliva (Dermeche et al., 2013). La Tabla 2 muestra un resumen del intervalo de valores que pueden alcanzar los parámetros físico-químicos y químicos del alpechín.

Tabla 2. Características y composición química del alpechín (Dermeche et al., 2013; Paredes et al., 1999; López et al., 1996).

Parámetros	Rango de valores*
Materia seca (%)	4,12 – 16,38
pH	2,24 - 6,71
Conductividad eléctrica (dS/m)	4,00 – 13,98
Carbono total (%)	2,0 – 3,3
Materia orgánica (% p.s.)	57,2 – 70,63
Carbono orgánico total (g/L)	20,19 – 39,8
Materia mineral (%)	0,4 – 7,2
Nitrógeno total (%)	0,58 – 1,13
P (%)	0,06 – 0,032
K (%)	0,44 – 6,94
Na (%)	0,04 – 0,48
Ca (%)	0,32 – 1,15
Mg (%)	0,06 – 0,22
Fe (mg/kg)	652 – 1482
Cu (mg/kg)	14 – 44
Mn (mg/kg)	1 – 53
Zn (mg/kg)	31 – 82
Lípidos (%)	0,03 – 11,37
Fenoles totales (%)	0,63 – 5,45
Azúcares totales (%)	1,5 – 32,91
DQO (g/L)	30 – 320
DBO (g/L)	10 – 132

El componente mayoritario del alpechín es el agua que constituye entre 83-96% del peso total. Además, disuelta o en suspensión, contiene una elevada proporción de materia orgánica (3,5-15%) y en torno a 0,15-2% de sustancias inorgánicas (Justino et al., 2012; Asses et al., 2009). La carga orgánica del alpechín es responsable de su elevada DQO (demanda química de oxígeno) que suele oscilar entre 50 y 150 g/L, valores que suponen sobre dos órdenes de magnitud superior a la de las aguas residuales municipales (McNamara et al., 2008). Los principales componentes orgánicos del alpechín son azúcares, polifenoles, ácidos orgánicos, alcoholes y lípidos. El típico color oscuro del alpechín es atribuido a la presencia de polímeros fenólicos. Estas sustancias representan una estructura similar a la lignina y constituyen la fracción más resistente a la biodegradación de estos residuos (Ahmed et al., 2019). Además, presenta una gran capacidad antiespumante y un fuerte efecto tampón en el rango de pH entre 4 y 5, derivados principalmente de su contenido en ácidos orgánicos y sales (López et al., 1996).

Los azúcares presentes en el alpechín constituyen de un 2 a 8% de la materia orgánica y se han identificado como azúcares libres o mediante hidrólisis: fructosa, manosa, glucosa, galactosa, sacarosa, pentosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y rafinosa (McNamara et al., 2008; López et al., 1996). El contenido en azúcares suele disminuir cuando el alpechín se almacena. Esto se debe a que pasa a incorporarse a la matriz de polímeros o es biotransformado por microorganismos (Dermeche et al., 2013; López et al., 1996). Los ácidos orgánicos (de naturaleza no fenólica) suponen entre un 0,5-1,5% de la materia orgánica. Junto con otros componentes, contribuyen a aportar el pH ácido y el efecto tampón del alpechín. Los principales ácidos orgánicos identificados son ácido acético, fumárico, glicérico, láctico, málico, malónico, tartárico, tricarbálico, oxálico, cítrico, mícico, y trazas de succínico y hexónico (López et al., 1996). Otros componentes de la fracción orgánica del alpechín son los polialcoholes, entre los que se han encontrado inositol, arabitol y, principalmente, manitol, que predomina frente a los anteriores, así como polisacáridos integrados por pectinas y mucílagos. Estos últimos pueden estar constituidos mayoritariamente por galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y ácidos urónicos, aunque también forman parte de esta fracción hemicelulosa, taninos y aceite (López et al., 1996).

El contenido inorgánico del alpechín está compuesto principalmente por metales. Los minerales más abundantes son el potasio (0,44-6,94%), seguido del calcio y sodio (0,32-1,15% y 0,04-0,48%, respectivamente). Los metales son importantes tanto desde el

punto de vista nutricional como desde el punto de vista toxicológico. Algunos metales, especialmente el cobre, el hierro y el zinc, son esenciales para el metabolismo de las plantas. Hay que señalar que el alpechín es un tipo de residuo con alto potencial para ser utilizado como fertilizante, si se controla su poder contaminante, ya que contiene recursos potenciales como una alta concentración de materia orgánica y elevado número de nutrientes minerales (Souilem et al., 2017; Dermeche et al., 2013; Roig et al., 2008).

Los polifenoles y fenoles simples (0,5 a 1% de la materia orgánica) conforman el grupo de los compuestos fenólicos y ha sido uno de los más estudiados por su influencia sobre varios aspectos (López et al., 1996). A ellos se atribuyen efectos nocivos ambientales, además tienen un elevado potencial de aprovechamiento para distintos fines (Abu-Lafi et al., 2017). Por otro lado, los compuestos fenólicos presentes en los huesos y pulpa de las aceitunas tienden a ser más solubles en la fase acuosa que en la oleosa, lo que se traduce en concentraciones en el alpechín que oscilan entre 0,5 y 25 g/L (Rodis et al., 2002). Se han reportado más de 30 compuestos fenólicos en el alpechín que varían enormemente en cuanto a tipo y concentración. Éstas grandes diferencias en la composición y características de los compuestos fenólicos del alpechín dependen no sólo de la localización geográfica, sino también por el tipo de proceso utilizado, las condiciones de uso diario y los procedimientos operativos locales (McNamara et al., 2008; Niaounakis and Halvadakis, 2006). Las principales familias de los compuestos fenólicos identificados en el alpechín son los ácidos fenólicos, secoiridoides y flavonoides (Dermeche et al., 2013). Los compuestos fenólicos presentes en el alpechín también se pueden dividir, en función de su masa molecular, en compuestos de bajo peso molecular (tirosoles, hidroxitirosoles, ácido p-cumárico, ác. ferúlico, ác. siríngico, ác. protocatéquico, etc.) y de alto peso molecular (taninos, antocianinas, etc.) (Souilem et al., 2017). Los primeros predominan en el alpechín y se pueden agrupar a su vez, de acuerdo con Mantzavinos y Kalogerakis (2005), en tres grandes familias: derivados del ácido cinámico, derivados del ácido benzoico y derivados del tirosoles (Fig. 3). La concentración de los compuestos fenólicos más abundantes en el alpechín se muestra en la Tabla 3.

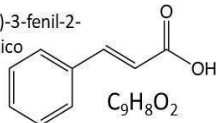
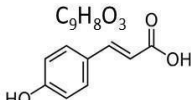
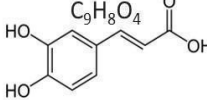
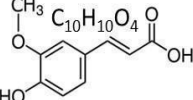
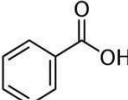
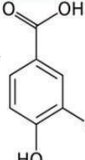
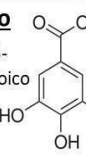
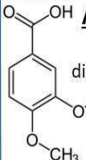
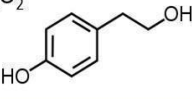
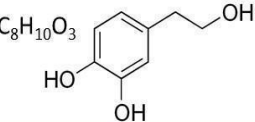
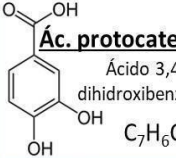
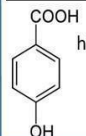
<p>Ácido cinámico y derivados</p> <p>Ácido (E)-3-fenil-2-propenoico</p>  <p>$C_9H_8O_2$</p>	<p>Ác. p-cumárico</p> <p>Ácido (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico</p>  <p>$C_9H_8O_3$</p>	<p>Ác. cafeico</p> <p>Ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoico</p>  <p>$C_9H_8O_4$</p>	<p>Ác. ferúlico</p> <p>Ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)prop-2-enoico</p>  <p>$C_{10}H_{10}O_4$</p>
<p>Ácido benzoico y derivados</p> <p>Ácido benzoico</p>  <p>$C_7H_6O_2$</p>	<p>Ác. vainílico</p> <p>Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico</p>  <p>$C_8H_8O_4$</p>	<p>Ác. gálico</p> <p>Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico</p>  <p>$C_7H_6O_5$</p>	<p>Ác. verátrico</p> <p>Ácido 3,4-dimetoxibenzoico</p>  <p>$C_9H_{10}O_4$</p>
<p>Tirosol y derivados</p> <p>4-(2-hidroxietil) fenol</p>  <p>$C_8H_{10}O_2$</p>	<p>Hidroxitirosol</p> <p>4-(2-hidroxietil)-benceno-1,2-diol</p>  <p>$C_8H_{10}O_3$</p>	<p>Ác. protocatecuico</p> <p>Ácido 3,4-dihidroxibenzoico</p>  <p>$C_7H_6O_4$</p>	<p>Ác. hidroxibenzoico</p> <p>Ácido 4-hidroxybenzoico</p>  <p>$C_7H_6O_3$</p>

Figura 3. Principales compuestos fenólicos del alpechín. Nombre IUPAC, fórmula química y estructura molecular (Dermeche et al., 2013).

Tabla 3. Cuantificación de los principales compuestos fenólicos del alpechín (Asses et al., 2009).

Compuesto fenólico	Rango de valores* (mg/L)
Hidroxitirosol	3451 – 931
Tirosol	439 – 116
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	175 – 67
Ácido vainílico	191
Ácido caféico	3 – 36
Ácido cumárico	1 – 16
Ácido ferúlico	2 – 97

*El rango de valores varía dependiendo del tiempo de almacenamiento del alpechín.

Además de los compuestos fenólicos mostrados en la Fig. 3, también han sido detectados en el alpechín, aunque no se encuentren en elevada proporción, los siguientes: 4-metilcatecol, 3,4-dihidroxifenilglicol, alcohol homovanílico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, ácido, 2-(4-hidroxi-3-metoxi) feniletanol y 2-(3,4-dihidroxifenil)-1,2-etandiol (Aramendía et al., 1996; Capasso et al., 1992). A pesar de que se ha estipulado cuáles son los compuestos fenólicos más abundantes, tras recopilar información de una gran cantidad de estudios realizados (Dermeche et al., 2013), su caracterización es una

tarea de gran complejidad y la presencia y concentración de los mismos puede variar dependiendo de múltiples factores, como se ha mencionado anteriormente. Bianco et al. (2003) identificaron 20 compuestos fenólicos utilizando HPLC-MS-MS. Las clases predominantes de fenoles hidrofílicos identificados incluyen alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, derivados secoiridoides, flavonoides (luteolina, luteolina-7- glucósido) y lignanos. Por otro lado, Visioli et al. (2002) alegaron que la oleuropeína, un éster del ácido elenólico y del hidroxitirosol, es uno de los compuestos principales, mientras que Allouche et al. (2004) no lo detectaron en su estudio. Este hecho fue atribuido a que el alpechín procedía de aceitunas maduras y la oleuropeína se había degradado en ácido elenólico e hidroxitirosol, por la acción de una esterasa, durante el proceso mecánico de extracción de aceite de oliva.

Algunos componentes del alpechín, como son los compuestos fenólicos y algunos ácidos grasos de cadena larga, le confieren a este residuo características fitotóxicas y antimicrobianas (Ntougias et al., 2013; McNamara et al., 2008; Ramos-Cormenzana et al., 1996). Estos componentes junto con el bajo pH, y los altos valores de DQO y DBO, además de la elevada carga orgánica, convierten al alpechín en un residuo potencialmente tóxico y contaminante, lo cual supone uno de los mayores problemas ecológicos para los países productores de aceite de oliva (Dermeche et al., 2013; Stasinakis et al., 2008). El alpechín puede ocasionar graves daños medioambientales: desde la coloración de las aguas naturales y toxicidad de la vida acuática hasta la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, la alteración de la calidad del suelo, la fitotoxicidad y las molestias por olores (Dermeche et al., 2013).

1.3. Gestión del alpechín y problemática asociada: las balsas de evaporación

La producción de alpechín, se estima que alcanza anualmente entre los 7 y 30 millones de m³ (Tsagaraki et al., 2007). Los grandes volúmenes generados y su concentración temporal entre noviembre y marzo agravan su impacto ambiental cuando se vierte al medio ambiente sin ningún tipo de tratamiento (Dermeche et al., 2013).

El alpechín era tradicionalmente vertido en los ríos o sobre el terreno donde incluso se asociaba con un incremento de la fertilidad, por ello, esta práctica era ya recomendada desde el siglo XII por Abu-Zacaría. Este sistema de gestión no ocasionaba

un impacto medioambiental grave, debido a que la escasa producción no daba lugar a un caudal muy elevado de residuos y, por tanto, los vertidos se diluían al mezclarse con otras aguas o se depuraban en el suelo. A partir de los años 50, con el proceso de industrialización, el volumen de producción de alpechín fue en aumento. Durante la década de los 70, la modernización del sector y la sustitución del sistema de elaboración de aceite de oliva tradicional por los sistemas de elaboración continua implicaron la generación de más del doble de volumen de alpechín (López et al., 1996). Este nuevo escenario ocasionó el vertido incontrolado de grandes cantidades de alpechín en ríos y suelos cuyo impacto ambiental comenzó a ser patente.

Sin embargo, algo que se obviaba cuando la cantidad de residuos generada era asumible para el ecosistema, es que el alpechín vertido directamente al suelo tiene efectos perjudiciales, no sólo en el crecimiento de las plantas y la actividad microbiana, sino también en las propiedades físico-químicas del suelo: aumenta la hidrofobicidad del suelo, disminuye la retención de agua y la tasa de infiltración, así como afecta a la acidez, la salinidad, la inmovilización del nitrógeno, la actividad microbiana, la lixiviación de nutrientes, y la concentración de lípidos, ácidos orgánicos y fenoles (Doula et al., 2017; Sierra et al., 2007). El principal obstáculo para el uso directo del alpechín es su alta concentración de compuestos fenólicos que son fitotóxicos y pueden inhibir la germinación de las semillas. Además, el alpechín contiene compuestos oleosos que pueden aumentar la hidrofobicidad del suelo y disminuir la retención del agua y la tasa de infiltración (Kavvadias et al., 2010). Es importante destacar que suelos de diferentes orígenes pueden tener una capacidad de amortiguación intrínseca diferente y, por lo tanto, responder de forma distinta a las perturbaciones aplicadas (Piotrowska et al., 2011). En cuanto a la fitotoxicidad, El Hajjouji et al. (2007) usaron el test de micronúcleos de *Vicia faba* para evaluar la genotoxicidad del alpechín y encontraron que este residuo era genotóxico a una dilución del 10%. Esta genotoxicidad se asoció con el contenido en ácido gálico y oleuropeína del alpechín. El impacto del alpechín en el suelo parece ser el resultado de efectos opuestos, dependiendo de las cantidades relativas de compuestos orgánicos e inorgánicos beneficiosos y tóxicos (Piotrowska et al., 2011). Así, por ejemplo, Mechri et al. (2011) demostraron que las aplicaciones agronómicas del alpechín tienen impactos negativos en el funcionamiento de las micorrizas entre hongos y olivos. Esta misma conclusión fue descrita por Chartzoulakis et al. (2010) cuando estudiaron los efectos del alpechín en las propiedades del suelo, el rendimiento de las plantas y el

medioambiente, después de 3 años consecutivos de aplicaciones de alpechín a tasas crecientes de 252 m³/ha (1 año) a 420 m³/ha (durante 2 años). El estudio reveló una tasa significativa de potasio (K) disponible y un aumento de compuestos fenólicos con consecuencias desfavorables para el suelo. Más recientemente, Magdich et al. (2012) analizaron el impacto a largo plazo del efecto del alpechín empleado como agua de riego en los olivos, considerando la evolución de los compuestos fenólicos en el suelo, el progreso de la fitotoxicidad y el recuento de la microbiota en las diferentes capas del suelo. Para ello, se aplicaron tres caudales de alpechín con diferente velocidad de flujo (50, 100 y 200 m³/ha por año) durante tres años sucesivos. El contenido de polifenoles del suelo aumentó en función de la cantidad de alpechín aplicado. Además, los recuentos microbianos se incrementaron con la cantidad de alpechín y la frecuencia de pulverización. De hecho, el alpechín se sigue aplicando actualmente en suelos, práctica que ha suscitado controversias y debates en relación con el potencial contenido en fertilizantes y compuestos tóxicos de este subproducto. Sin embargo, las principales conclusiones de los investigadores son que la aplicación directa del alpechín sin tratamiento tiene un impacto negativo a largo plazo, pero con un control del volumen y tratamiento adecuados se podría reducir dicho impacto en el suelo y ser beneficioso con respecto a su acción fertilizante (Dermeche et al., 2013).

Por su parte, el vertido de alpechín en agua dulce reduce la disponibilidad de oxígeno lo que altera el equilibrio del ecosistema (Kapellakis et al., 2006). Además, la alta concentración de azúcares reducidos puede estimular la respiración microbiana, lo que reduce aún más las concentraciones de oxígeno disuelto. Si el alpechín se vierte en aguas con alto contenido en fósforo, puede ocasionar eutrofización (Dermeche et al., 2013). Las altas concentraciones de compuestos fenólicos, que confieren el característico color oscuro al residuo, pueden provocar el coloremiento de las aguas naturales (arroyos y ríos) (Niaounakis y Halvadakis, 2006). Así mismo, los lípidos del alpechín forman una película impenetrable en la superficie del agua receptora que bloquea la luz solar y el acceso de oxígeno, inhibiendo así el crecimiento de las plantas (Kapellakis et al., 2006).

La constatación de los efectos negativos en el equilibrio ecológico asociados al vertido incontrolado de alpechín en ríos y aguas superficiales, propició la imposición de un control más estricto sobre los vertidos en los cauces públicos, quedando estrictamente prohibida dicha práctica en todos los países productores de aceite de oliva (Tsagaraki et al., 2007). Con esta finalidad se promulgó en España el Real Decreto 3499/81 del 4 de

diciembre y las normas complementarias (Orden del 9 de junio de 1982) (Doula et al., 2017). Según estas disposiciones, se declaraba de utilidad pública la realización de obras que supusieran la neutralización o eliminación del alpechín producido por las almazaras cuyo destino era el vertido, directa o indirectamente, en los ríos. La propuesta por la que se optó entonces fue la disposición o acúmulo en balsas de evaporación al aire libre donde el alpechín se evapora gracias a la energía solar, principalmente durante el período estival. En España, el gobierno subvencionó y fomentó la construcción de estanques de almacenamiento para la evaporación del alpechín. Se construyeron alrededor de 1.000 estanques de evaporación. Estas medidas mejoraron la calidad de las aguas superficiales debido a la drástica disminución del vertido en cauces públicos. Sin embargo, este nuevo y extendido método de gestión del alpechín ocasionó otros problemas (Tsagaraki et al., 2007). En la práctica, este método de ha sido el más común debido a la baja inversión requerida y las condiciones climáticas de los países mediterráneos que favorecen la rápida evaporación del agua del alpechín. Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes, entre los que destaca el largo tiempo de permanencia de los residuos para su completa evaporación, entre 7 y 8 meses y, la necesidad de grandes superficies de terreno (alrededor de 1 m² por cada 2,5 m³ de alpechín) y los nuevos impactos y problemas de gestión que ocasiona (Azbar et al., 2004; Rozzi and Malpei, 1996). Un ejemplo de estas balsas de evaporación de alpechín se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Balsas de evaporación de alpechín ubicadas en el municipio de Mora (Toledo).

Las balsas de evaporación producen un impacto ambiental en las zonas cercanas a su ubicación, debido principalmente a los malos olores, proliferación de insectos, derrames y filtraciones. Por otra parte, su colmatación por los lodos que quedan tras la evaporación del agua constituye otro problema, ya que la limpieza no siempre se lleva a cabo por ser costosa y porque no siempre se ha encontrado utilidad para los lodos (López et al., 1996). El problema más grave surgió por la sustitución progresiva en muchas almazaras del sistema tradicional de presión por el de centrifugación en continuo, que produce más del doble de volumen de alpechín. Aunque paulatinamente se fue aumentando el número de balsas, fueron cada vez más frecuentes los accidentes de derrames y los vertidos incontrolados. Un ejemplo de ello fue la rotura de una balsa en Baeza (Jaén) en el año 1994 que supuso un vertido de 6×10^6 L al arroyo Matadero, afluente del río Guadalquivir. Además, la construcción de estanques de evaporación rara vez cumplía criterios de ingeniería para la estabilidad y alojamiento seguro de los residuos líquidos. Por lo tanto, el residuo líquido se desborda y afectaba a los suelos agrícolas adyacentes y a las aguas subterráneas. En la mayoría de los casos la base del estanque es permeable y, por tanto, la probabilidad de contaminar aguas subterráneas, así como capas más profundas del suelo, es considerada alta (Kavvadias et al., 2017; Kavvadias et al., 2010; Dermeche et al., 2013; Doula et al., 2009). En una escala de tiempo mayor, la aplicación de alpechín al suelo puede afectar a su capacidad de infiltración, con posibles efectos negativos en la calidad de las aguas subterráneas (Kavvadias et al., 2017; Sierra et al., 2001; Zenjari y Nejmeddine, 2001). En este contexto, Zenjari y Nejmeddine (2001) declararon que el esparcimiento del alpechín en el suelo podría aumentar la concentración de compuestos fenólicos en las aguas subterráneas durante el periodo activo de las almazaras. Por otro lado, si el alpechín se almacena en estanques abiertos o se vierte en suelos o aguas naturales, puede ser biodegradado anaeróbicamente y emitir metano y otros gases de olor acre como el sulfuro de hidrógeno, ocasionando una fuerte contaminación por olores (Niaounakis y Halvadakis, 2006). Teniendo en cuenta que la región mediterránea genera el 95% de la producción mundial de alpechín, la contaminación del aire tiene a veces un impacto negativo en la actividad económica de las zonas turísticas y arqueológicas. Se han realizado numerosos estudios que constatan los graves problemas ocasionados por las balsas de evaporación, entre los que destacan, además de los que se describen en esta Tesis Doctoral, los realizados en el contexto del proyecto PRODOSOL financiado por la Comisión Europea mediante el programa LIFE de demostración, titulado "Estrategias para mejorar y proteger la calidad del suelo frente a la eliminación de residuos de almazara en la región mediterránea" (<http://ec.europa.eu/environment/life/bestprojects/bestenv2014/index.htm>) (PRODOSOL). Los resultados de este proyecto demostraron que la eliminación incontrolada de alpechín

aumenta sustancialmente el riesgo de degradación del suelo. En el marco del proyecto, se controlaron durante dos años varias zonas destinadas a la eliminación de alpechín en Grecia, comprobándose que casi todos los parámetros físicos y químicos del suelo se vieron afectados, algunos de ellos de forma permanente.

Otro inconveniente, que ocasiona este método de eliminación de alpechín mediante su acúmulo en balsas de evaporación, es la producción de lodos o sedimentos (Figura 5). La mayor parte de estos lodos deberían ser recogidos tras el secado de la balsa y transferirse para su eliminación a una zona pública autorizada (vertederos) (Anastasiou et al., 2011). Aunque también se han propuesto otras alternativas, entre las que destacan su uso en agricultura, después de ser tratados adecuadamente, o como fuente de calor debido a su contenido en aceite (Roig et al., 2006). Actualmente existen pocos estudios sobre la valorización de estos lodos y la mayoría de ellos se centran en el compostaje. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Paredes et al. (2002) en el que estudiaron el co- compostaje de lodos de alpechín con paja de maíz y residuos de algodón, y concluyeron que podría tratarse de una alternativa adecuada para la eliminación de lodos de alpechín. Por su parte, Vitolo et al. (1999) propusieron la preparación de un combustible basado en la mezcla de residuo sólido de alpechín con la cáscara de aceituna. Otra forma imaginativa de reciclar estos residuos fue la propuesta por Hytiris et al. (2004), quienes estudiaron el potencial de utilizar lodos de alpechín como aditivo para el desarrollo de materiales de construcción. Actualmente existen todavía numerosas balsas de evaporación de alpechín, y aunque la mayoría de ellas se encuentra en desuso, surge la necesidad de buscar alternativas sostenibles para la gestión de los lodos de alpechín remanentes que allí se almacenan.



Figura 5. Ejemplo de lodos de alpechín originados como consecuencia de su eliminación en balsas de evaporación. La imagen muestra una balsa de evaporación de alpechín situada en el municipio de Mora (Toledo).

2. Tratamientos biológicos: biorremediación y aprovechamiento

Hace décadas, el mayor problema del ser humano residía en acelerar el proceso de industrialización. Hoy, sin embargo, las personas intentamos hacer frente a los problemas asociados precisamente a la creciente industrialización. Debido a este rápido desarrollo se produjeron grandes cantidades de residuos que ocasionaron problemas en vertederos, bosques y recursos hídricos, precisamente debido a la ineficiente o inexistente gestión de los mismos (Thassitou y Arvanitoyannis, 2001). El vertido indiscriminado e incontrolado de residuos industriales y urbanos en el ambiente se ha convertido en un problema de gran preocupación mundial (Strong y Burgess, 2008; Gupta y Mahapatra, 2003; Hernández et al., 1998). La intensificación de la agricultura y las industrias manufactureras ha dado lugar a un aumento de la liberación de una amplia gama de compuestos xenobióticos al medio ambiente (Chatterjee et al., 2008). El exceso de carga de residuos peligrosos ha provocado la escasez de agua limpia y la alteración del suelo, lo que limita la producción de cultivos (Kamaludeen et al., 2003). La degradación del suelo se ha identificado como un problema ambiental crucial y creciente, tanto en Europa como en el resto del mundo. Aunque no se ha determinado con exactitud la extensión de suelos contaminados, se considera que son muchos contaminantes los responsables de dicha contaminación (Tabla 4). Los plaguicidas y fertilizantes son la principal fuente de contaminación, seguidos de los efluentes de procesos industriales, la eliminación de residuos y los lodos de aguas residuales, así como los vertidos accidentales (Thassitou y Arvanitoyannis, 2001).

Tabla 4. Los principales contaminantes del suelo (Schippers et al., 2013).

Contaminante	Presencia (%)
Metales pesados	37,3
Aceite mineral	33,7
HAPs	13,3
BTEX	6
Fenoles	3,6
CHCs	2,4
Otros	3,6

*HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; BTEX: hidrocarburos aromáticos; CHCs: hidrocarburos clorados.

Aunque la promulgación de una normativa estricta ha permitido reducir el vertido indiscriminado de residuos orgánicos e inorgánicos (Kamaludeen et al., 2003), siguen existiendo problemas que requieren otras intervenciones. Una vez que una zona está contaminada, el siguiente paso es aplicar medidas correctoras. A lo largo de los años, se

han probado, utilizado, aprobado o rechazado muchos métodos. La forma más común, ineficaz y barata de tratar las zonas contaminadas es ignorar deliberadamente su existencia. Cuando la situación se agrava, se puede acudir a los métodos convencionales, como la prevención y la reducción, la reutilización, el empleo de materiales degradables, el reciclaje, la incineración, la pirólisis y el vertido, o a los métodos u opciones modernos e innovadores que incluyen la biodegradabilidad y la biorremediación (Thassitou y Arvanitoyannis, 2001). En comparación con otros métodos, la biorremediación es una forma más prometedora y menos costosa de limpiar el suelo y el agua contaminados (Kamaludeen et al., 2003; Eccles y Hunt, 1986), ya que utiliza agentes biológicos, principalmente hongos o bacterias, para limpiar el suelo y agua contaminados (Chatterjee et al., 2008; Strong y Burgess, 2008).

2.1. Definición y aspectos básicos

La biorremediación es un concepto general que incluye todos aquellos procesos y acciones que tienen lugar para transformar un entorno, ya alterado por los contaminantes, mediante la acción de organismos vivos o sus componentes y devolverlo a su estado original (Thassitou y Arvanitoyannis, 2001). La biorremediación es una importante estrategia de remediación de suelos y aguas subterráneas porque: aprovecha los procesos geobiológicos naturales, destruye o inmoviliza los contaminantes, y conserva los recursos financieros debido a la reducción del tiempo de limpieza y/o los menores gastos de capital respecto a muchas otras tecnologías de saneamiento (GZA Geo Environmental, 1998). Por tanto, la biorremediación es un procedimiento ecológico, no invasivo, más barato que los métodos convencionales, y es una solución permanente que puede terminar con la degradación o transformación de los contaminantes ambientales en formas inocuas o menos tóxicas (Dzionic et al., 2016; Xu; Lu, 2010).

La biorremediación puede producirse de forma natural o mediante procesos de intervención (Agarwal, 1998). La degradación o atenuación natural de los contaminantes depende de la microbiota autóctona presente en la ubicación contaminada, que es eficaz contra contaminantes específicos, aunque suele producirse a un ritmo lento. Con los procesos de intervención, la tasa de biodegradación se ve favorecida por el fomento del crecimiento de los microorganismos, en condiciones químicas y físico-químicas optimizadas (Bouwer et al., 1998; Smith et al., 1998). Los organismos naturales, ya sean autóctonos o exógenos (introducidos), son los principales agentes utilizados para la

biorremediación (Chatterjee et al., 2008; Prescott et al., 2002). En dicho proceso, los microorganismos utilizan los contaminantes como fuentes de nutrientes o energía (Chatterjee et al., 2008; Tang et al., 2007; Agarwal, 1998; Hess et al., 1997). Por lo tanto, la biorremediación se puede definir como el proceso natural por el que los microorganismos inmovilizan o transforman los contaminantes ambientales en productos finales inocuos. El establecimiento y mantenimiento de condiciones favorables para el crecimiento microbiano y el control del proceso son requisitos básicos para el éxito de este tipo de procedimientos (Chatterjee et al., 2008; Agarwal, 1998). Teniendo en cuenta que el proceso de biorremediación se basa, fundamentalmente, en las actividades de los microorganismos, para una degradación eficiente deben estar presentes los microbios específicos del sustrato en cuestión, así como deben darse las condiciones ambientales favorables. En caso contrario, se considera a dichos factores como limitantes del proceso de biorremediación (Chatterjee et al., 2008; Smith et al., 1998). Los microorganismos que tienen la capacidad fisiológica y metabólica de degradar los contaminantes pueden ser tanto bacterias como hongos. Entre los factores que influyen en la biorremediación (Tabla 5) están las fuentes de energía (donadores de electrones), los aceptores de electrones, los nutrientes, el pH, la temperatura y los sustratos o metabolitos inhibidores (Jagadevan y Mukherji, 2004).

Tabla 5. Factores que afectan a la biorremediación (Chatterjee et al., 2008).

Factor	Limitación
Microbiano	Crecimiento para la producción de biomasa crítica, inducción de enzimas, enriquecimiento de las poblaciones microbianas con capacidades potenciales y producción de metabolitos tóxicos
Ambiental	Agotamiento de sustratos preferentes y condiciones ambientales inhibitorias
Sustrato	Concentración demasiado baja de los contaminantes, estructura química, toxicidad y solubilidad de los contaminantes
Proceso aeróbico vs anaeróbico	Potencial de oxidación/reducción y disponibilidad de aceptores de electrones
Sustrato de crecimiento vs co-metabolismo	Tipo de contaminantes, disponibilidad de una fuente de carbono alternativa, interacción microbiana (competencia, sucesión y depredación)
Biodisponibilidad físico-química de contaminantes	Absorción en equilibrio, absorción irreversible, incorporación a las materias húmicas
Limitaciones de transferencia de masa	Difusión de oxígeno, solubilidad y difusión de nutrientes, solubilidad/miscibilidad con el agua

La biorremediación del suelo puede llevarse a cabo en el lugar de la contaminación (*in situ*) o en un lugar especialmente preparado y destinado para ello (*ex situ*). La tecnología *in situ* se utiliza cuando no hay posibilidad de trasladar el suelo contaminado, por ejemplo, cuando la contaminación afecta a una zona extensa e implica el tratamiento de los contaminantes en el lugar donde se encuentran. En este caso los microorganismos (autóctonos o exógenos) entran en contacto directo con los contaminantes y los utilizan como fuente de energía favoreciendo su transformación (Dzionic et al., 2016; Thassitou y Arvanitoyannis, 2001; Bouwer y Zehnder, 1993). Estos microorganismos se ven obligados por las condiciones ambientales a adaptarse o morir, o bien han sido modificados genéticamente para actuar en circunstancias y ambientes concretos (Ellis y Gorder, 1997). Si se desea que la degradación microbiana continúe o se promueva, deben añadirse al suelo nutrientes convenientemente seleccionados (Litchfield, 1993). La principal ventaja del tratamiento *in situ* es que no se necesita ninguna excavación ni equipo especial. Esto supone automáticamente un menor coste y una menor perturbación del entorno natural. Además, al no requerir excavación, el método es ideal para tratar zonas rocosas, costas o de aguas subterráneas (Thassitou y Arvanitoyannis, 2001; Litchfield, 1993). Algunas técnicas de biorremediación *in situ* son descritas con más detalle en el apartado “2.2. Estrategias de biorremediación”. Aunque este método tiene varias ventajas, también existen algunas limitaciones para su aplicación generalizada. Dado que el proceso *in situ* es lento, no es la mejor estrategia cuando se desea una limpieza inmediata del lugar (Iwamoto y Nasu, 2001). Por otra parte, del proceso metabólico de degradación pueden obtenerse, en ocasiones, subproductos indeseables, que pueden ser tóxicos. En algunos casos, sobre todo cuando no hay un control adecuado en la distribución de nutrientes, no se sabe con certeza si las sustancias objeto de descontaminación lograron alcanzar el grado de transformación deseado o si, por el contrario, los contaminantes se extendieron hacia otras regiones. Esto implica, por supuesto, que el proceso de remediación se prolongue y que la ecología de otra zona pueda ser perturbada (Chatterjee et al., 2008; Litchfield, 1993). Por lo general, la biorremediación *in situ* es más difícil de mantener bajo control que la *ex situ* porque los controles experimentales son más difíciles de monitorizar en los suelos contaminados (Thassitou y Arvanitoyannis, 2001). La biorremediación *ex situ* es un método diferente que utiliza instalaciones de tratamiento especialmente construidas para ello. Durante los

procesos *ex situ*, la matriz contaminada se excava o se extrae y se traslada al lugar de procesado. Los métodos *ex situ* permiten una eliminación más eficaz de los contaminantes, mediante el control de los parámetros físico-químicos y de emisiones, lo que se traduce en una reducción del tiempo total de recuperación y menor impacto. Estas ventajas superan los inconvenientes de los métodos *ex situ*, entre los que destaca el riesgo relacionado con la posibilidad de dispersión de la contaminación durante el transporte. No obstante, este método cuenta con dos desventajas de peso, en comparación con la biorremediación *in situ*: resulta más caro (Dzionic et al., 2016; Chatterjee et al., 2008) y puede provocar un impacto visual y ambiental notable en la zona de extracción.

En la actualidad, existen tres técnicas biológicas generales para tratar la contaminación ambiental del suelo y las aguas con microorganismos, englobadas, por tanto, dentro del concepto de biorremediación (Dzionic et al., 2016):

(a) Atenuación natural. La atenuación natural está relacionada con las actividades de degradación de los microorganismos autóctonos. Este método favorece la eliminación de los compuestos tóxicos y evita dañar el hábitat permitiendo que el ecosistema vuelva a su estado original. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, se produce a un ritmo muy lento.

(b) Bioestimulación. La estimulación de la actividad de los microorganismos autóctonos mediante la adición de nutrientes, la regulación de las condiciones redox, la optimización de las condiciones de pH, etc. Algunos ejemplos de estrategias de biorremediación basadas en el método de bioestimulación son landfarming, compostaje y vermicompostaje.

(c) Bioaugmentación. La inoculación del lugar contaminado con microorganismos exógenos con capacidades específicas de biotransformación.

Las tecnologías o estrategias disponibles para biorremediación de matrices sólidas (ej. suelo) o líquidas como aguas residuales y efluentes líquidos industriales se resumen en las Tablas 6 y 7, respectivamente. Adicionalmente, existen otras técnicas de biorremediación para eliminar y/o transformar los contaminantes ambientales que, además de microorganismos, utilizan productos derivados de los mismos u otros organismos. Estas técnicas son la fitorremediación y el vermicompostaje, basadas en el uso de plantas y lombrices, respectivamente; o aquellas que aplican enzimas inmovilizadas (Chatterjee et al., 2008; Agarwal, 1998; Bollag y Bollag, 1995).

Tabla 6. Principales métodos aplicados en la biorremediación de suelos (Juwarkar et al., 2010; Chatterjee et al., 2008; Thassitou y Arvanitoyannis, 2001).

Tecnología	Fundamento	Aplicación
Landfarming	Sistema de tratamiento en fase sólida. Puede hacerse <i>in situ</i> o en una celda construida para el tratamiento del suelo.	Contaminación superficial. Proceso aeróbico. Nivel de contaminación bajo o medio.
Bioventing	Ventilación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno a través para estimular el crecimiento y la actividad microbiana.	Contaminación del suelo por combustibles, compuestos orgánicos volátiles (COV) no halogenados y compuestos orgánicos semivolátiles (COVS), pesticidas y herbicidas.
Compostaje	Proceso aeróbico. Convertir los residuos orgánicos sólidos en material estable e higienizado similar al humus.	Aplicación en superficie. Residuos agrícolas y humanos. Lodos de depuradora, residuos industriales, residuos de jardín, residuos sólidos municipales.
Biorremediación intrínseca	Se basa en la capacidad natural de asimilación del suelo para proporcionar la recuperación del lugar y controlar la migración de contaminantes.	Contaminación profunda. Condiciones aeróbicas o de reducción de nitratos. Niveles de contaminación bajos o medios. Aceites, gasolina, aromáticos clorados, hidrocarburos clorados.
Biorreactor de lodos	El suelo y el agua se agitan juntos en el reactor.	Contaminación superficial. Compuestos recalcitrantes. Suelo que aglutina fuertemente los compuestos. Procesos aeróbicos y anaeróbicos.

Tabla 7. Métodos aplicados en la biorremediación de aguas (Chatterjee et al., 2008).

Tecnología	Fundamento	Aplicación
Precipitación o floculación	Reacción de complejación físico-química no dirigida entre los contaminantes disueltos y los componentes celulares (biomasa muerta)	Eliminación de metales pesados
Intercambio iónico	Elimina los iones de la fase acuosa mediante el intercambio de cationes o aniones entre los contaminantes y el medio de intercambio.	Eliminación de los metales disueltos y los radionúclidos de las soluciones acuosas
Ósmosis reversa	La aplicación de una presión fuerza el flujo de agua de una solución más concentrada a otra más diluida	Desalinización de agua de mar; eliminación de contaminantes y microorganismos
Microfiltración	Las membranas de microfiltración son usadas a una presión constante	Tratamiento de aguas residuales; recuperación y reutilización de más del 90% de las aguas residuales originales
Electrodialisis	Utiliza pares de membranas de intercambio catiónico y aniónico	Eliminación de sólidos disueltos eficientemente

2.2. Estrategias de biorremediación *in situ*

2.2.1. Landfarming

Entre las diversas tecnologías de biorremediación, el landfarming se considera la más económica. Las ventajas de este método de biorremediación son: (a) menos tiempo y coste que otras operaciones de remediación; (b) destrucción completa del material de desecho; (c) interrupción limitada de la actividad en el lugar de la contaminación; (d) capacidad de manejar grandes volúmenes; y (e) opinión pública favorable (Othman et al., 2011; Kelley et al., 1998). El principio subyacente del landfarming es el uso de comunidades microbianas para eliminar los contaminantes orgánicos, principalmente a través de su conversión en CO₂ y agua (Lukić et al., 2017; Straube et al., 2003). Dado que la eficacia de la biorremediación se ve afectada por la liberación de compuestos orgánicos volátiles (COV) a la atmósfera, así como por la adsorción de los contaminantes en las partículas del suelo, los principales mecanismos de eliminación que intervienen en el landfarming son la volatilización de los COV durante la fase inicial de la contaminación o el tratamiento, la biodegradación y la adsorción (Lukić et al., 2017). Basándose en la naturaleza de sus procesos bioquímicos, el landfarming se considera aeróbico. Aunque el landfarming es eminentemente de aplicación *in situ*, también existe la posibilidad de ejercer dicho tratamiento sobre el material contaminado *ex situ*, tras su excavado y transporte a la instalación de tratamiento (Lukić et al., 2017; Beškoski et al., 2012).

El landfarming consiste en un tratamiento en fase sólida en el que el suelo se trata como un cultivo, es decir, aportándole las condiciones necesarias para favorecer el crecimiento y desarrollo de los microorganismos presentes que llevarán a cabo la biodegradación de los contaminantes. Para ello, se utilizan técnicas agrícolas convencionales para aportar el oxígeno y nutrientes necesarios mediante la aireación del suelo y la adición de enmiendas. La profundidad del suelo dependerá de lo que se puede cultivar o arar fácilmente con equipos agrícolas convencionales (Lukić et al., 2017). El landfarming *in situ* suele aplicarse en la capa superficial del suelo a profundidades de hasta 50 cm, aunque la difusión efectiva de oxígeno necesaria para la biorremediación en la mayoría de los suelos sólo puede lograrse a profundidades inferiores a 30 cm. Normalmente se añaden agentes de relleno al suelo para aumentar la porosidad, tras lo cual el suelo contaminado se mezcla periódicamente para garantizar un suministro de aire adecuado. Adicionalmente, se añade agua para mantener las condiciones de humedad

idóneas que favorezcan la actividad microbiana. La Figura 6a muestra un ejemplo de aplicación *in situ* de landfarming que es adecuado cuando el suelo contaminado es poco profundo y está confinado por una capa de arcilla o suelo impermeable. Las desventajas críticas de este método son la inviabilidad de un control riguroso del proceso, el largo tiempo de ejecución y la baja efectividad en suelos impermeables (Othman et al., 2011). La eficiencia del landfarming *in situ* como técnica de biorremediación depende en gran medida de las características del suelo (textura del suelo, contenido de humedad, número de microorganismos, pH) y de las condiciones climáticas (precipitaciones, viento y temperatura) (Joo et al., 2007). Maila y Cloete (2004) concluyeron que el éxito del landfarming dependía de condiciones específicas, como un suelo bien drenado, una presencia abundante de microorganismos, la biodegradabilidad de los contaminantes por parte de los mismos, así como un espacio cerrado necesario para minimizar la erosión del suelo y la escorrentía de la lluvia y para controlar las emisiones atmosféricas. Las condiciones ambientales adecuadas incluyen el valor del pH, la disponibilidad de nutrientes y el contenido de humedad. Por otro lado, el tratamiento *ex situ* requiere un tiempo de tratamiento más corto, es más fácil de controlar y puede tratar una gama más amplia de contaminantes en comparación con el tratamiento *in situ*. Sin embargo, el landfarming *ex situ* requiere costes adicionales para la excavación y el transporte del material contaminado, así como costes de capital para construir y equipar las estructuras de tratamiento. Por último, hay costes adicionales de mano de obra y energía (Othman et al., 2012). La unidad de tratamiento interior típica de landfarming es similar a un invernadero (Figura 6b).

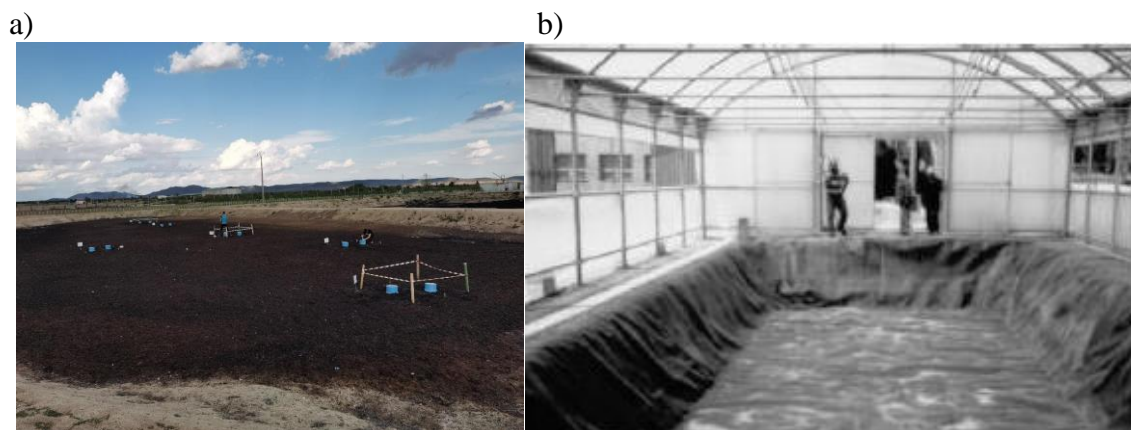


Figura 6. a) Landfarming *in situ* para la biorremediación de lodos de alpechín (proyecto LIFE16 ENV/ES/000331). b) Unidad de tratamiento *ex situ* típica de landfarming (Picado et al., 2001).

Cualquier sistema de tratamiento en tierra necesita un plan de seguimiento para controlar el proceso de biodegradación y verificar la reducción de las concentraciones de contaminantes. Además, es necesario realizar cuidadosos análisis de la calidad de las aguas subterráneas y del aire para demostrar que los contaminantes están contenidos en la zona de tratamiento y no han migrado a otros ambientes (Lukić et al., 2017). Los procesos de landfarming deben realizarse con el objetivo de prevenir efectos adversos en el medio ambiente, así como de evitar la transferencia de contaminantes del suelo a otras partes del ecosistema como el aéreo o el acuático. Antes de iniciar el proceso de landfarming, es interesante estudiar su viabilidad determinando los tipos de microorganismos autóctonos presentes en el suelo y su actividad metabólica, la presencia de inhibidores y la biodegradabilidad y biodisponibilidad de los contaminantes (Maila y Cloete, 2004).

Este proceso ha sido ampliamente utilizado por la industria de procesamiento de aceites minerales, ya que es un método sencillo y rentable para remediar los suelos contaminados accidentalmente por vertidos residuales a base de petróleo (Beškoski et al., 2012; Maila y Cloete, 2004). De hecho, buena parte de la industria petrolera estadounidense comenzó a utilizar el landfarming a principios de los años 70 para tratar dichos residuos mezclándolos con el suelo con el fin de estimular la biodegradación del aceite mineral vertido. A partir de esta experiencia, el landfarming se desarrolló teniendo en cuenta diferentes factores relacionados con la remediación sostenible de los suelos contaminados: coste, requisitos de espacio, tiempo, demanda de energía, uso de materias primas y aceptación pública (Harmsen et al., 2007). Más recientemente, la eliminación biológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) mediante landfarming se ha aplicado comercialmente a gran escala con relativo éxito (Lukić et al., 2017).

2.2.2. Fitorremediación

El término genérico "fitorremediación" consiste en el prefijo griego phyto (planta), unido a la raíz latina remedium (corregir o eliminar un mal) (Cunningham et al., 1996). La fitorremediación es una tecnología de remediación *in situ* que utiliza las capacidades inherentes de las plantas vivas para reducir, degradar o inmovilizar contaminantes orgánicos (Figura 7) (Etim, 2012). Ya sea por sí solas o junto con los microorganismos, las plantas se utilizan para acelerar la tasa de degradación o de

eliminación de los contaminantes (Prescott et al., 2002). La fitorremediación es un término amplio que se utiliza desde 1991 para describir el uso de plantas para reducir el volumen, la movilidad o la toxicidad de contaminantes tales como metales, pesticidas, explosivos y petróleo, en el suelo, las aguas subterráneas u otros medios contaminados (Etim, 2012). Las plantas también ayudan a evitar que el viento, la lluvia y las aguas subterráneas arrastren los contaminantes desde los lugares afectados a otras zonas (Etim, 2012). Por lo tanto, se puede definir la fitorremediación como una tecnología *in situ* no destructiva y rentable que puede utilizarse para la limpieza de suelos contaminados. Puede combinarse con las tecnologías mecánicas de limpieza convencionales o, en algunos casos, en sustitución de ellas, ya que suelen requerir grandes inversiones de capital y requieren mucha mano de obra y energía (Erakhrumen y Agbontalor, 2007).

Los mecanismos y la eficacia de la fitorremediación dependen del tipo de contaminante, su biodisponibilidad y las propiedades del suelo (Scott y David, 1996). Hay varias estrategias que emplean las plantas para limpiar o remediar los lugares contaminados. La absorción de contaminantes se produce principalmente a través del sistema radicular, en el que se encuentran los principales mecanismos implicados en la reducción de la toxicidad (Etim, 2012). El sistema radicular proporciona una enorme superficie de absorción de agua y nutrientes esenciales para el crecimiento junto con otros contaminantes no esenciales (Raskin y Ensley, 2000). El éxito de cualquier sistema de remediación basado en plantas depende de la interacción de los exudados de las raíces y los microorganismos en la rizosfera. Los microorganismos asociados a las plantas y presentes en el suelo, incluidas bacterias, actinobacterias hongos, algas y protozoos, desarrollan relaciones simbióticas y sinérgicas muy complejas. Entre ellos, los microorganismos desempeñan un papel crucial para determinar el destino de los contaminantes. Se han documentado hasta 100 veces más microorganismos en la rizosfera que en la zona de suelo externa al sistema radicular. Los microorganismos están presentes de manera tan abundante y frecuente en el entorno de las raíces debido a que los exudados de azúcares, aminoácidos, enzimas y otros compuestos estimulan el crecimiento microbiano (Etim, 2012). Durante la rizerremediación, los exudados de las plantas pueden ayudar a potenciar el crecimiento, la supervivencia y la acción microbiana de estos organismos, actuando como bioestimulantes, lo que se traduce en una degradación más eficaz de los contaminantes. Las raíces también proporcionan una superficie adicional para que los microorganismos crezcan y una vía para la transferencia de oxígeno

desde el ambiente (Chatterjee et al., 2008; Wenzel, 1992). Por su parte, los microorganismos proporcionan protección a la planta al restringir el contacto con sustancias químicas potencialmente tóxicas y actuando como competencia frente a otros considerados fitopatógenos. La Figura 7 muestra un ensayo de fitorremediación desarrollado en el proyecto LIFE+REGROW en cuyo contexto se enmarca esta Tesis Doctoral.



Figura 7. Aplicación de fitorremediación *in situ* de lodos de alpechín (proyecto LIFE16 ENV/ES/000331).

Se han identificado cinco mecanismos generales por los que las plantas pueden afectar a los contaminantes en el suelo, los sedimentos y el agua, los cuáles se detallan en la Tabla 8, en la que también se incluyen algunos ejemplos de plantas implicadas en dichos mecanismos. Un ejemplo de la efectividad de esta tecnología es el alto potencial que supone su uso en los trópicos debido a las condiciones climáticas imperantes que favorecen el crecimiento de las plantas y estimulan la actividad microbiana (Zhang et al., 2010). Además de las funcionalidades descritas en la Tabla 8, algunas plantas también tienen la capacidad de transpirar grandes volúmenes de agua y, por tanto, de controlar el equilibrio hídrico existente en el lugar. El aumento de la transpiración reduce la infiltración de las precipitaciones (reduciendo así la lixiviación de los contaminantes de

la zona vadosa) o aumenta la transpiración de las aguas subterráneas, reduciendo así la migración de contaminantes en las plumas de aguas subterráneas (Etim, 2012).

Tabla 8. Tipos de fitorremediación Adaptado de Etim (2012) y Chatterjee et al. (2008).

Proceso	Fundamento	Contaminante	Plantas
Fitoextracción	Eliminación de los metales contaminantes que se acumulan en las plantas Eliminación de los elementos orgánicos del suelo concentrándolos en partes de la planta	Cd, Pb, Zn, As	<i>Viola</i> <i>baoshanensis</i> <i>Sedum alfredii</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Helianthus annuus</i>
Fitodegradación	Las plantas y los microorganismos asociados degradan los contaminantes orgánicos	DDT, hidrocarburos de petróleo, HAPs, disolventes clorados, pesticidas, BPCs, benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos	<i>Elodea canadensis</i> <i>Pueraria thunbergiana</i>
Rizofiltración	Las raíces absorben y adsorben contaminantes, principalmente metales, del agua y de los flujos acuosos de residuos	Zn, Pb, Cd, As, Cu, Ni, Cr	<i>Brassica juncea</i> <i>Helianthus annuus</i>
Fitoestabilización	Uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes en el medio ambiente	Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, As	<i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Festuca arvernensis</i> <i>Koeleria vallesiana</i> <i>Armeria arenaria</i>
Fitovolatilización	Uso de plantas para volatilizar contaminantes	Se, CCl ₄ , EDB, TCE	<i>Stanleya pinnata</i> <i>Zea mays</i> <i>Brassica sp.</i>

*HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; BPCs: bifenilos policlorados

Mucho antes de denominarla como técnica potencial de tratamiento de contaminantes, hace al menos 300 años, ya se reconocía la capacidad de las plantas para eliminar los contaminantes del suelo. Las plantas se han aprovechado en diversas aplicaciones, incluyendo su combinación con otros tratamientos como, por ejemplo, tras

el landfarming (Etim, 2012). Con el tiempo, este uso ha evolucionado hasta la construcción de humedales de tratamiento o incluso la plantación de árboles para contrarrestar la contaminación atmosférica. En años más recientes, a medida que crecía el reconocimiento de los daños resultantes en todo el mundo tras décadas de economía industrial y uso extensivo de productos químicos, también aumentó el interés por encontrar tecnologías que pudieran hacer frente a la contaminación residual, entre ellas la fitorremediación ((Etim, 2012).

2.2.3. Compostaje

El compostaje es un proceso de tratamiento aeróbico y termófilo en el que el material contaminado se mezcla con un agente acondicionante. El proceso puede realizarse mediante pilas estáticas, pilas aireadas o reactores de alimentación continua. Por tanto, el compostaje es un proceso comúnmente aplicado para degradar residuos sólidos orgánicos y convertirlos en compost, una enmienda del suelo rica en sustancias húmicas y nutrientes (Moreno y Moral, 2008). Juwarkar et al. (2010) también lo han definido como un proceso de descomposición aeróbica microbiana controlada, cuyo destino es la formación de materiales orgánicos estabilizados que pueden ser utilizados como acondicionadores del suelo. Durante el compostaje, la descomposición de sustratos orgánicos ocurre en presencia de suficiente oxígeno. Los principales productos del metabolismo microbiano son el dióxido de carbono, el agua y cantidades considerables de calor. Por lo tanto, se trata de un proceso biológico basado en la actividad degradadora de los microorganismos aerobios sobre materiales orgánicos apilados (Figura 8), lo que resulta en la liberación de calor (termogénesis) y la producción de un material sólido y biológicamente estable, junto a otros compuestos como el dióxido de carbono y el agua.

Los principales factores que intervienen en el control de un proceso de compostaje incluyen parámetros ambientales (temperatura, contenido de humedad, pH y aireación) y parámetros relativos a la naturaleza del sustrato (relación C/N, tamaño de las partículas y contenido de nutrientes) (Artola et al., 2009). Estos factores se correlacionan entre sí física, química y biológicamente en las complicadas relaciones que ocurren entre los microorganismos y su entorno a lo largo del proceso. Un ligero cambio en un único factor puede provocar una drástica avalancha de cambios metabólicos y físicos en el proceso global (Agnew y Leonard 2003). Por lo tanto, estos parámetros deben ser controlados. Algunas de las consideraciones más importantes a tener en cuenta son que el contenido

de humedad sea de aproximadamente el 60%, el valor del pH oscile entre 6 y 7,5, la concentración de oxígeno entre el 5% y el 15% del volumen total, y la relación C/N de los materiales de partida debe ser de 25 a 30 (Sayara et al., 2010). El proceso se desarrolla a partir en una matriz de partículas orgánicas y poros interconectados, parcialmente llenos de aire, solución acuosa o una combinación de ambos (Artola et al., 2009).



Figura 8. Pilas de compostaje ubicadas en el municipio de Mora (Toledo). Proyecto LIFE16 ENV/ES/000331.

Una multitud de microorganismos y sus enzimas son responsables del proceso de biodegradación, lo que da lugar a un complejo sistema bioquímico-microbiano (Juwarkar et al., 2010). Debido a ello, durante este proceso de biotransformación de la materia orgánica se suceden distintas variaciones de temperatura relacionadas con las poblaciones microbianas predominantes y la biodisponibilidad de los materiales sometidos al proceso. En condiciones óptimas, el compostaje se desarrolla en cuatro fases sucesivas: (a) la fase mesófila o de temperatura moderada, (b) la fase termófila o de alta temperatura, (c) la fase de enfriamiento y, (d) la fase de maduración. Las primeras fases constituyen la etapa activa en la que se produce calor. Esta etapa activa se rige por los principios básicos de la transferencia de calor y masa y por las limitaciones biológicas de los microorganismos vivos (Mudhoo y Mohee 2008). Por otro lado, la evolución de la disponibilidad de sustrato a lo largo del proceso permite la sucesión de poblaciones microbianas con diferentes requerimientos metabólicos. Desde esta perspectiva, las fases anteriormente citadas se pueden agrupar a su vez en dos etapas globales, bio-oxidativa (que comprenden las tres primeras fases, en las que hay una gran disponibilidad de nutrientes y elevada

actividad microbiana) y maduración (limitación de nutrientes y reducción de la actividad microbiana) (Moral y Moreno, 2008).

El proceso de compostaje puede contribuir positivamente a la eliminación de contaminantes orgánicos de los suelos debido a la intensa actividad microbiana, al aumento de la temperatura, a la adición de una fuente de carbono y nutrientes (efecto de bioestimulación) y a la adición de un amplio número de microorganismos especializados en la degradación de compuestos orgánicos y ya presentes en los residuos orgánicos (efecto de bioaumentación) (Juwarkar et al., 2010). La biodegradación de los contaminantes sólidos tiene lugar principalmente como resultado de la oxidación y la hidrólisis (Agnew y Leonard 2003). Un factor clave durante el compostaje es la accesibilidad microbiana a los contaminantes y las características de los agentes modificadores. La elevada temperatura típica de un proceso de compostaje correctamente realizado puede aumentar la cinética bioquímica implicada en el proceso de biodegradación, es decir, la solubilidad de los contaminantes y la tasa de transferencia de masa, haciendo así que los contaminantes sean más accesibles y estén disponibles para para el metabolismo microbiano (Lukić et al., 2017).

Debido a su naturaleza compleja y dinámica, el proceso de compostaje es uno de los más intrincados desde el punto de vista de la ingeniería. No obstante, la cinética del proceso macroscópico ha sido relativamente bien diseñada hasta la fecha para tratar una amplia variedad de residuos orgánicos, tales como los residuos sólidos municipales, la cama de las aves de corral, los residuos vegetales, los residuos del procesamiento de alimentos y los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales y otros procesos generadores de lodos (Juwarkar et al., 2010). A través del compostaje, es posible reducir el volumen de residuos en los vertederos (Dzionic et al., 2016). Así mismo, en el campo de la biorremediación del suelo, el compostaje también ha ganado recientemente interés como medio para eliminar los contaminantes y se ha aplicado para la descontaminación de suelos con disolventes, clorofenoles, pesticidas, herbicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y derivados nitroaromáticos (Dzionic et al., 2016; Sayara et al., 2010).

Los principales objetivos de esta estrategia de biorremediación ecológica y económica son la biotransformación de los contaminantes orgánicos en sustancias menos tóxicas o compuestos inocuos, como el dióxido de carbono y el agua (proceso denominado "mineralización"), y la adsorción de los contaminantes a la matriz orgánica,

lo que afecta a su biodisponibilidad, biodegradabilidad, lixiviabilidad, volatilidad y persistencia en el medio ambiente (Lukić et al., 2017). Por otro lado, la configuración de este proceso, junto con el aporte extra de nutrientes, derivado de la habitual mezcla de materiales residuales empleados de partida, y el ajuste de la humedad, favorecen el enriquecimiento de la comunidad microbiana autóctona del suelo contaminado (Sayara et al., 2010). Además, el riesgo de contaminación por patógenos es pequeño, porque la mayoría de ellos se inactivan entre los 55-70°C. Este método es respetuoso con el medio ambiente, tiene protocolos sencillos, permite controlar grandes volúmenes de residuos y puede terminar con la mineralización total de los contaminantes orgánicos.

2.2.4. Vermicompostaje

Se denomina vermicompostaje o vermiestabilización al proceso de conversión, por parte de las lombrices de tierra, de la materia biodegradable en vermicompost (Juwarkar et al., 2010). En el proceso, una fracción importante de los nutrientes contenidos en la materia orgánica se transforma en formas más biodisponibles. El primer paso en el vermicompostaje se produce cuando las lombrices rompen el sustrato en pequeños fragmentos al ingerirlo, esto aumenta la superficie del sustrato, facilitando las acciones microbianas y enzimáticas. El sustrato ingerido pasa por un proceso de "digestión enzimática" donde intervienen numerosas especies de bacterias, así como las propias enzimas presentes en el digestivo de las lombrices (Gajalakshmi y Abbasi, 2008). Existe en literatura abundante información sobre la fuerte relación mutualista entre los microorganismos y las lombrices (Figura 9), que podría ser beneficiosa en términos de una mejor degradación de los residuos orgánicos y de determinados contaminantes, así como de la calidad de los compost y vermicompost cuando se utilizan como sustratos nutricionales, en particular para los suelos (Singh et al., 2011). Los microorganismos que se encuentran en el aparato digestivo de las lombrices se nutren de la materia orgánica y la descomponen en partículas más finas. De este modo, los microorganismos proporcionan alimento a las lombrices de tierra, y éstas, a su vez, promueven una mayor actividad microbiana al producir materia fecal consumida por los microorganismos, obteniéndose un ambiente biológicamente más activo (Edwards, 1988).



Figura 9. Lombrices de tierra de la especie *Eisenia foetida* aplicadas en el proceso de vermicompostaje de lodos de alpechín (proyecto LIFE16 ENV/ES/000331).

En el compostaje los responsables de la descomposición aeróbica de los residuos orgánicos son los microorganismos, mientras que el vermicompostaje implica la combinación de los microorganismos y las lombrices (Singh et al., 2011). La temperatura para el desarrollo óptimo de las lombrices en el proceso de vermicompostaje está en torno a los 35 °C. En el compostaje convencional se alcanzan hasta 70 °C, por lo que la combinación de ambos procesos, compostaje seguido de vermicompostaje, garantiza la higienización de la materia orgánica y, además, con la labor de las lombrices se favorece la degradación y la obtención de productos con mejor características mejoradas en cuanto a estructura y calidad nutricional. Este escenario, basado en un enfoque integrado compuesto por los procesos de compostaje seguido de vermicompostaje, se considera idóneo para lograr un mejor rendimiento transformativo (Ali et al., 2015). Existen dos posibilidades que se proponen generalmente para el enfoque integrado del compostaje y el vermicompostaje: (i) prevermicompostaje seguido de compostaje o (ii) precompostaje seguido de vermicompostaje (Ndegwa y Thompson, 2001). Utilizando el segundo enfoque, Gajalakshmi et al. (2002) lograron un mejor rendimiento del proceso combinado.

La selección de las especies de lombrices apropiadas para la degradación de los residuos orgánicos y los contaminantes que se desea eliminar es un asunto de gran importancia para obtener mejores resultados. Se han llevado a cabo varias investigaciones sobre el uso de lombrices como agentes biorremediadores para mejorar la capacidad de reducción/eliminación de contaminantes orgánicos (Tabla 9). Estos incluyen una amplia

gama de contaminantes, apoyando la enorme aplicabilidad del uso de las lombrices, tales como insecticidas, herbicidas, aceites crudos, HAPs, bifenilos policlorados (BPCs), conservantes de madera clorofenólicos, 2,4,6- trinitrotolueno (TNT) y el metamitron (Zachary et al., 2008; Contreras-Ramos et al., 2006).

Tabla 9. Especies de lombrices con capacidad de degradar compuestos contaminantes (Zachary et al., 2008).

Clase de contaminantes	Compuesto contaminante	Especie de lombriz
Herbicidas	Atrazina	<i>Lumbricus rubellus</i> , <i>Allophoran caliginosa</i> , <i>L. terrestris</i> , <i>A. giardi</i> , <i>A. longa</i>
	2,4-D, Metsulfuron metilo	<i>L. rubellus</i> , <i>A. caliginosa</i>
	Isoproturón, Dicamba	<i>A. longa</i>
	Metacloro	<i>L. terrestris</i>
Insecticidas	HCH, DDT	<i>Pheretima posthuma</i> , <i>Metaphire posthuma</i>
Aceites crudos y productos petroquímicos	Lodos de refinería de petróleo	<i>Eisenia fetida</i>
	Aceites crudos	<i>E. fetida</i> , <i>L. terrestris</i> , <i>A. chlorotica</i>
	Petróleo	<i>E. fetida</i>
	Aceite	<i>E. fetida</i>
	Fluidos de perforación de hidrocarburos	<i>E. fetida</i>
	Asfaltenos	<i>E. fetida</i>
HAP	Fenantreno, fluoranteno	<i>L. rubellus</i> , <i>E. fetida</i>
	Antraceno, Benceno pireno	<i>E. fetida</i>
Aromáticos clorados	Aroclor 1242	<i>Pheretima hawaiiiana</i> ,
	Aroclor 1248	<i>E. fetida</i>
	Conservadores de la madera clorofenólicos	<i>A. caliginosa</i> , <i>L. rubellus</i>
Otros	2,4,6-trinitrotolueno	<i>Eisenia Andrei</i>
	Di-(2-ethylhexyl) phthalate	<i>L. terrestris</i>
	3-metilcolantreno y fenobarbitol	<i>Dendrobaena veneta</i>
	4-fluoroanilina, 4-fluorobifenilo	<i>E. fetida</i>

*HCH: Hexaclorohesano; HAP: hidrocarburos aromáticos policíclicos; HTP: hidrocarburos totales de petróleo.

Los mecanismos que emplean estos organismos incluyen el aumento de la sorción de los contaminantes a los excrementos y digestivo de las lombrices; la rotura de enlaces de los compuestos y liberación de monómeros; y la limitación de la unión de los mismos, hasta su posterior degradación. Por tanto, la utilización de lombrices en la biorremediación de contaminantes orgánicos parece tener varias ventajas. Además, las lombrices tienen el potencial de ser empleadas no sólo en la producción de vermicompost y en la recuperación de suelos contaminados como parte de una estrategia de biorremediación, sino también en la posterior mejora de ese suelo, en términos de estructura y estado nutricional (Ali et al., 2015; Hickman y Reid, 2008). La Tabla 10 resume algunos estudios en los que se ha empleado el proceso de vermicompostaje como estrategia de biorremediación.

Tabla 10. Estudios de degradación de compuestos químicos mediante vermicompostaje.

Contaminante	Especie lombriz	Rendimiento	Referencia
Bifenilos policlorados	<i>E. fétida</i>	Las lombrices de tierra sobrevivieron y se reprodujeron en presencia de medios contaminados. La cromatografía de gases demostró una reducción del 80% en el nivel de BPC en todos los biorreactores de vermicompostaje.	Tharakan et al. (2006)
Lodos de la industria de las bebidas	<i>E. fétida</i>	La degradación de la mezcla 50:50 de lodo biológico y estiércol bovino pudo lograrse en 75 días cuando las lombrices fueron inoculadas a 25 g/kg de mezcla de alimentación.	Singh et al. (2010)
Lodos de la industria de la destilación mezclados con un agente acondicionante (estiércol de vaca)	<i>Perionyx Excavatus</i>	Las lombrices de tierra pudieron maximizar la tasa de descomposición y mineralización cuando los lodos se usaron con material apropiado para la alimentación de las lombrices. El vermicompostaje también provocó una reducción significativa de la concentración total de metales en los lodos.	Suthar y Singh (2008)
Fenantreno, antraceno y benzo(a)pireno	<i>E. fétida</i>	La eliminación media de antraceno por parte de los microorganismos autóctonos fue del 23%, del 77% para el fenantreno y 13% para el benzo(a)pireno, mientras que dicha eliminación fue del 51%, 100% y 47%, respectivamente, en el suelo con lombrices. Con 50 y 100 mg de fenantreno/kg la supervivencia de <i>E. fétida</i> fue del 91 y el 83%, pero con 150 mg/kg todos murieron en 15 días.	Contreras-Ramos et al. (2006)

Cabe considerar que la adaptabilidad a los residuos, la tolerancia a los agentes contaminantes, el tiempo de tránsito intestinal, la rápida tasa de crecimiento y el potencial reproductivo de las lombrices son algunas de las características generales que deben tenerse en cuenta antes de iniciar la actividad de vermicompostaje como método de biorremediación (Hickman y Reid, 2008; Edward, 1988).

2.3. Bioaumentación: inoculantes para biorremediación

Cuando no existe presencia de microorganismos degradadores o cuando el proceso es demasiado lento, se pueden añadir inóculos microbianos para mejorar las tasas de biorremediación. Esta técnica se conoce como bioaumentación (Dzionic et al., 2016) y puede implicar (a) la adición de microorganismos aislados naturales u (b) organismos modificados genéticamente (OMG). El empleo de estos últimos es controvertido, existen normas rígidas que regulan la liberación de los OMG, ya que existe preocupación por sus posibles impactos negativos en el medio ambiente.

Los organismos empleados para la biorremediación varían dependiendo de la naturaleza química de los contaminantes, por lo que deben seleccionarse cuidadosamente, ya que sólo sobreviven dentro de un rango limitado de contaminantes químicos (Chatterjee et al., 2008; Dubey, 2004; Prescott et al., 2002). Además, dado que en un ambiente contaminado pueden encontrarse varios tipos de agentes contaminantes, es probable que se requieran diversos tipos de microorganismos para llevar a cabo la bioaumentación y poder alcanzar una biorremediación completa y efectiva del ambiente (Watanabe et al., 2001). En las Tablas 11 y 12 se recogen microorganismos implicados en la biotransformación de metales pesados y xenobióticos, respectivamente. La primera patente de un agente biológico útil en remediación se registró en 1974 y se corresponde con una cepa de *Pseudomonas putida* (Prescott et al., 2002) capaz de degradar el petróleo. En 1991 se descubrió e informó sobre la existencia de unos 70 géneros microbianos degradadores de compuestos a base de petróleo (Congress, U.S., 1991), y un número casi igual se añadió a la lista en las dos décadas siguientes. Estos organismos pertenecen a, al menos, 11 divisiones procariotas diferentes (Glazer y Nikaido, 2007).

Tabla 11. Microorganismos capaces de utilizar metales pesados (Watanabe et al., 2001).

Micoorganismo	Elementos	Referencias
<i>Bacillus</i> spp.	Cu, Zn	Philip et al., 2000; Rajendran et al., 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	U, Cu, Ni	Sar et al., 1999; Sar y D'Souza, 2001
<i>Zooglea</i> spp.	Co, Ni, Cd	Rajendran et al., 2003
<i>Citrobacter</i> spp.	Cd, U, Pb	Yan y Viraraghavan, 2001; Rajendran et al., 2003
<i>Chlorella vulgaris</i>	Au, Cu, Ni, U, Pb, Hg, Zn	Pearson, 1969; Rajendran et al., 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Cd, Zn, Ag, Th, U	Guibal et al., 1995; Rajendran et al., 2003
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cd, Cu, Zn	Favero et al., 1991
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Ag, Hg, P	Rajendran et al., 2003
<i>Stereum hirsutum</i>	Cd, Pb, Ca	Gabriel et al., 1994 y 1996
<i>Phormidium valderium</i>	Cd, Co, Cu, Ni	Gabriel et al., 1994 y 1996
<i>Ganoderma applantus</i>	Cd, Pb	Gabriel et al., 1994 y 1996
<i>Volvariella volvacea</i>	Cu, Hg, Pb	Purkayastha y Mitra, 1992; Jagadevan y Mukherji, 2004
<i>Daedalea quercina</i>	Zn, Pb, Cu	Sanglimsuwan et al., 1993; Gabriel et al., 1994 y 1996

Tabla 12. Microorganismos con potencial de biodegradación de xenobióticos.

Organismo	Sustancia química tóxica	Referencia
<i>Pseudomonas</i> spp.	Benceno, antraceno, hidrocarburos, BPCs	Kapley et al., 1999; Cybulski et al, 2003
<i>Alcaligenes</i> spp.	Hidrocarburos halogenados, alquilbenceno lineal, sulfonatos, HAPs, BPCs	Lal y Khanna, 1996
<i>Athrobacter</i> spp.	Benceno, hidrocarburos, pentaclorofenol, fenoxiacetato, HAPs	Jogdand, 1995
<i>Bacillus</i> spp.	Aromáticos, alcanos de cadena larga, fenol, cresol	Cybulski et al., 2003
<i>Corynebacterium</i> spp.	Hidrocarburos halogenados, fenoxiacetatos	Jogdand, 1995
<i>Flavobacterium</i> spp.	Aromáticos	Jogdand, 1995
<i>Azotobacter</i> spp.	Aromáticos	Jogdand, 1995
<i>Rhodococcus</i> spp.	Naftaleno, bifenilo	Dean-Ross et al., 2002
<i>Mycobacterium</i> spp.	Aromáticos, hidrocarburos ramificados, cicloparafinas	Lee, 1995
<i>Nocardia</i> spp.	Hidrocarburos	Park et al., 1998
<i>Methosinus</i> sp.	Aromáticos	Jogdand, 1995
Methanogens	Aromáticos	Jogdand, 1995
<i>Xanthomonas</i> spp.	Hidrocarburos, HAPs	Jogdand, 1995; Ijah, 1998
<i>Streptomyces</i> spp.	Fenoxiacetato, hidrocarburo halogenado diazinón	Jogdand, 1995
<i>Candida tropicalis</i>	Formaldehido, BPCs	Ijah, 1998
<i>Cunniughamela elegans</i>	BPCs, HAPs, bifenilos	Jogdand, 1995

*HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos; BPCs: bifenilos policlorados

A pesar del potencial de los microorganismos mencionados, su empleo en estrategias de bioaumentación ha dado lugar a diversos grados de éxito. Gertler et al. (2009) aplicaron un prototipo experimental de barrera petrolífera que incluía sorbentes de petróleo, fertilizantes de liberación lenta y biomasa de la bacteria marina degradadora de petróleo, *Alcanivorax borkumensis*, para la sorción y degradación del petróleo pesado en un experimento de mesocosmos de 500 L. Estos autores encontraron que el crecimiento obligado de dicha bacteria degradadora en el petróleo inmovilizado coincidió con un aumento de 30 veces en la respiración total. Anteriormente, Bento et al. (2005) evaluaron el efecto de la bioaumentación en la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTPs) en el suelo. Se demostró que la bioaumentación del suelo contaminado mostró la mayor degradación en las fracciones ligera (72,7%) y pesada (75,2%) del HTP, ya que la mayor actividad microbiana (actividad deshidrogenasa) se había producido con la bioaumentación siendo 3,3 veces mayor. Jacques et al. (2008) evaluaron la capacidad de un consorcio microbiano constituido por cinco bacterias (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans* y una bacteria de la familia Microbacteriaceae degradadora de naftalina) y un hongo, identificado como *Fusarium oxysporum*, aislados de un vertedero contaminado con HAPs para degradar y mineralizar diferentes concentraciones (0, 250, 500 y 1.000 mg/kg) de antraceno, fenantreno y pireno en el suelo. Según los resultados obtenidos, el consorcio microbiano degradó un promedio de 99, 99 y 96% de las diferentes concentraciones de antraceno, fenantreno y pireno, respectivamente, en el suelo tras 70 días de tratamiento. Domde et al. (2007) demostraron, igualmente, una disminución del 52,2% de la DQO en un reactor bioaumentado, mientras que sólo se observó una reducción del 15,1% en el reactor sin bioaumentar. También sugirieron que el conjunto de genes presentes en el reactor bioaumentado tenía loci catabólicos que permitían degradar los productos intermedios acumulados, mejorando así la eficiencia del sistema en general. Posteriormente, Teng et al. (2010) realizaron un estudio basado en microcosmos para probar el potencial de biorremediación de la cepa HPD-2, identificada como *Paracoccus* sp., en un suelo contaminado con HAPs. Los microcosmos bioaumentados mostraron una disminución del 23,2% en las concentraciones totales de HAP en el suelo después de 28 días, con una disminución de la concentración media de 9,9 a 7,6 µg/kg de suelo seco, y se observaron mayores recuentos de bacterias degradadoras de HAP cultivables, biomasa microbiana y actividades enzimáticas en el suelo bioaumentado. Por otro lado, Cerrone et al. (2010) utilizaron las cepas *Azotobacter chroococcum* H23 (CECT 4435), *Azotobacter vinelandii*

UWD y *Azotobacter vinelandii* (ATCC 12837) para demostrar su capacidad de crecimiento y acumulación de PHAs a partir de alpeorujo en condiciones anaeróbicas. Los resultados obtenidos en ese estudio sugieren las perspectivas de uso de estas cepas bacterianas para producir PHAs a partir de alpeorujo y, paralelamente, contribuir eficazmente a la biorremediación de estos residuos.

3. Tratamiento de alpechín: alternativas sostenibles para su valorización

Al igual que todos los residuos del procesado de alimentos, el alpechín ha sido considerado durante mucho tiempo una cuestión preocupante por los problemas derivados de su tratamiento, minimización y prevención debido a los efectos ambientales inducidos por su eliminación (Galanakis, 2012). La mayoría de los tratamientos descontaminantes del alpechín tienen como objetivo la degradación de la materia orgánica y de los compuestos fenólicos y, por tanto, la reducción de la demanda química de oxígeno y de la toxicidad. Sin embargo, las dificultades del tratamiento del alpechín están relacionadas principalmente con su alta carga orgánica, la temporalidad en su producción, la elevada dispersión territorial y la presencia de compuestos orgánicos recalcitrantes, como los ácidos grasos de cadena larga y los compuestos fenólicos (Souilem et al., 2017). Se han sugerido numerosos procesos diferentes para tratar el alpechín y paliar los efectos ambientales derivados de su eliminación directa en suelos y aguas, algunos mencionados anteriormente, como el almacenamiento en estanques de evaporación. Estos procesos se pueden clasificar en las siguientes categorías (Souilem et al., 2017): (1) Reducción de residuos mediante la conversión de los sistemas de producción de aceitunas (es decir, sistemas bifásicos en lugar de trifásicos continuos); (2) Métodos de destoxificación destinados a reducir el impacto de la carga contaminante en el receptor; y (3) Recuperación o reciclaje de los componentes del alpechín.

Los tratamientos fisicoquímicos (Tabla 13) más relevantes aplicados para la gestión del alpechín incluyen métodos como la evaporación, la ósmosis inversa, la ultrafiltración, la coagulación, la oxidación, el secado térmico y las tecnologías de oxidación avanzada como la ozonización, los procesos Fenton y la oxidación electroquímica (Rahmanian et al., 2014).

Tabla 13. Tratamientos físicos, físico-químicos y térmicos del alpechín (Souilem et al., 2017).

Metodología	Descripción
Sedimentación, filtración, flotación, centrifugación	Eliminación de los sólidos totales mediante un proceso de separación física.
Micro-, ultra-, nanofiltración, ósmosis inversa	Separación de compuestos (existentes en la misma fase) según su peso molecular.
Centrifugación/ Ultrafiltración	Eliminación de sólidos en suspensión mediante centrifugación previa y separación selectiva del sobrenadante mediante ultrafiltración.
Adsorción/desorción	Proceso basado en la retención/liberación de sustancias. Ejemplo: uso de resinas no iónicas XAD4, XAD16 y XAD7HP para la separación de compuestos fenólicos recuperados.
Evaporación, destilación, secado por aspersión	Eliminación de agua y reducción de residuos.
Combustión, pirólisis	Proceso basado en la descomposición y eliminación de residuos mediante calor y oxidación.
Destilación solar/Combinado	Uso de la radiación solar y altas temperaturas ambientales/Uso de membrana de destilación.
Neutralización, precipitación y adsorción	Eliminación de compuestos mediante separación química. Ejemplos: adición de FeCl ₃ , Ca(OH) ₂ /MgO, Na ₂ SiO ₃ , adsorción en carbón activo.
Procesos de oxidación y oxidación avanzada	Procesos basados en la formación de radicales hidroxilo con acción oxidante. Electro-Fenton (método electroquímico basado en la regeneración de Fe(II) a partir de Fe(III) mediante la reacción con H ₂ O ₂); ozonólisis (aplicación de ozono como oxidante); oxidación húmeda (oxidación de la materia empleando H ₂ O ₂ como oxidante y temperatura y presión superior a la ambiental).
Tratamiento con cal	Estabilización del alpechín mediante el ajuste del pH y la floculación y precipitación de sólidos.
Electrocoagulación	Proceso de desestabilización de los compuestos orgánicos recalcitrantes, ya estén en suspensión, emulsionados o disueltos, mediante la acción de corriente eléctrica directa de bajo voltaje y por la acción de electrodos metálicos.
Extracción de puntos de la nube	Aplicación de un surfactante para la separación de los compuestos fenólicos.

Aunque se utilizan varios procesos fisicoquímicos para el tratamiento del alpechín, estos no son completamente exitosos. Su aplicación suele estar asociada a problemas de viabilidad y rentabilidad a gran escala, que pueden ir acompañados, además, de otros problemas técnicos o ambientales relacionados con la emisión de contaminantes atmosféricos, el colmatado de las membranas, la toxicidad inducida por especies radicales y la formación de grandes cantidades de lodos tóxicos, entre otros. Los procesos físicos

suelen aplicarse como paso previo al tratamiento para eliminar los sólidos contenidos. Los procesos térmicos se utilizan para eliminar el agua contenida y condensar los flujos de residuos, pero son ineficaces debido al coste operativo necesario. A pesar de su eficacia, los procesos de oxidación avanzada también son muy caros (Souilem et al, 2017; Rahmanian et al., 2014). Por otro lado, entre los tratamientos biológicos del alpechín (Tabla 14), la digestión anaeróbica se ha propuesto como una tecnología prometedora para la gestión de los residuos de la industria del aceite de oliva para producir energía (biogás). Sin embargo, todavía hay que superar numerosos obstáculos como la inhibición del crecimiento de las arqueas metanogénicas por la presencia de compuestos fenólicos, el bajo pH, la reducida concentración de nitrógeno, etc (Orive et al., 2016). Otras alternativas biológicas son los métodos aeróbicos, incluyendo el compostaje, así como los tratamientos con hongos, bacterias y algas (Doula et al., 2017; Souilem et al., 2017).

Tabla 14. Tratamientos biológicos del alpechín (Souilem et al., 2017).

Metodología	Descripción
Procesos anaerobios	Degradación de sustancias orgánicas en ausencia de oxígeno mediante la acción de microorganismos anaerobios. Para ellos se llevan a cabo: dilución, adición de nutrientes y regulación de la alcalinidad.
Procesos aerobios	Eliminación de los contaminantes orgánicos mediante su transformación por la acción de microorganismos y en presencia de oxígeno. Algunos ejemplos son: co-compostaje de alpechín con corteza de sésamo, formación de biofilm, activación de lodos de alpechín.
Mezcla y digestion	Digestión anaeróbica simultánea de múltiples residuos orgánicos, con características complementarias.
Procesos enzimáticos	Tratamiento del alpechín con enzimas. Un ejemplo son las lacasas, enzimas capaces de degradar eficientemente los compuestos fenólicos del alpechín

El éxito de cada método depende de la tecnología utilizada. No obstante, algo importante a tener en cuenta respecto a cualquier alternativa de tratamiento biológico, es el hecho de que no sólo puede constituir una estrategia sostenible para la gestión del alpechín, sino económicamente interesante, por ejemplo, mediante el aprovechamiento del potencial nutritivo de esta corriente de residuos para la producción de diversos compuestos de alto valor añadido (Ahmed et al., 2019). Por otra parte, el tratamiento biológico requiere una fase de retardo más larga, mientras que los métodos fisicoquímicos, como la neutralización y la precipitación, son relativamente más rápidos, pero no pueden disminuir por completo la carga contaminante del alpechín. A raíz de las consideraciones previamente descritas, mediante diferentes investigaciones se han

propuesto numerosos tratamientos combinados (químicos, físicos y biológicos) (Azbar et al., 2004). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos ha encontrado una aplicación ampliamente aceptada, ya que no se ha demostrado que sean sostenibles a largo plazo (Ahmed et al., 2019; Souilem et al., 2017). Por ejemplo, Zagklis et al. (2013) llevaron a cabo un estudio de sostenibilidad y evaluación comparativa de los métodos de tratamiento de alpechín, mostrando que los procesos más eficaces, en términos de reducción de sustancias orgánicas, son la filtración por membrana, la electrólisis, la oxidación con agua supercrítica y el foto-Fenton. Los procesos de digestión anaeróbica, coagulación y cal tienen un menor impacto ambiental, mientras que los métodos de menor coste son el compostaje y la filtración por membrana, debido al valor añadido de los compost y los compuestos fenólicos, respectivamente. Deben desarrollarse metodologías más integradas que combinen los procesos de tratamiento, reciclaje, valorización y producción de energía, permitiendo la recuperación de compuestos de alto valor añadido y alcanzando los límites estándar para reutilizar el efluente depurado para el riego o la industria. Este concepto, típicamente considerado dentro del enfoque de la biorrefinería (Jong y Jungmeier, 2015), hace que el proceso de tratamiento sea rentable y resulte en una producción de aceite de oliva respetuoso con el medio ambiente. La Tabla 15 resume algunos de estos enfoques de valorización.

Tabla 15. Metodologías propuestas para la valorización del alpechín (Ahmed et al., 2019; Souilem et al., 2017).

Proceso	Objetivo
Adsorción/desorción de flujo continuo	Recuperación de compuestos fenólicos
Extracción con líquidos iónicos hidrofóbicos	Recuperación de tirosol
Proceso integrado: tecnologías de fermentación, secado por aspersión y encapsulación	Obtención de pasta de aceitunas para untar y polvo de aceitunas, y encapsulación de compuestos fenólicos
Destilación solar	Secado de alpechín y recuperación de compuestos fenólicos
Fermentación oscura	Producción de biohidrógeno
Hidrólisis enzimática/microfiltración-ultrafiltración	Recuperación natural de hidroxitirosol
Impregnación en biomásas secas	Producción de biocombustibles sólidos
Baño de tinte para lana	Obtención de tintes naturales para el teñido de textiles
Producción de ladrillos de arcilla cocida	Obtención de materiales para construcción cerámica
Proceso de fabricación de ladrillos	Obtención de ladrillos para construcción

El alpechín podría utilizarse como sustrato para el crecimiento de microorganismos y la producción de fertilizantes, bioproductos y piensos, o como fuente barata para la recuperación de compuestos como los fenoles (por ejemplo, hidroxitirosol, oleuropeína, ácidos fenólicos, taninos, flavonoles, antocianinas, etc.) y la fibra dietética (por ejemplo, pectina) (Ahmed et al., 2019; Rodis et al., 2002). Estos últimos se utilizan hoy en día como aditivos en los alimentos debido a su capacidad para proporcionar propiedades tecnológicas avanzadas y declaraciones de propiedades saludables al producto final (Souilem et al., 2017; Galanakis, 2012). De hecho, varios estudios han demostrado que los fenoles se caracterizan por una amplia gama de propiedades y actividades biológicas como la antioxidante, la eliminación de radicales libres, la antiinflamatoria, la anticancerígena y la antimicrobiana (Abu-Lafi et al., 2017). Se han propuesto varias técnicas (individuales o combinadas) para recuperar los compuestos fenólicos del alpechín. Estas técnicas incluyen la extracción con disolventes, las separaciones cromatográficas, la centrifugación, los procesos de membrana (Rahmanian et al., 2014) y, más recientemente, las descargas eléctricas de alto voltaje, el campo eléctrico pulsado y los ultrasonidos (Roselló-Soto et al., 2015). Los procesos de separación por membranas se encuentran entre las principales técnicas fisicoquímicas y no destructivas aplicadas para la separación de macro y micromoléculas en los flujos de residuos alimentarios (Galanakis, 2012). El tratamiento del alpechín mediante operaciones de membrana se centra generalmente en el desarrollo de sistemas integrados para producir efluentes de calidad aceptable para su eliminación segura en el medio ambiente (Zirehpour et al., 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación directa del alpechín con fines agronómicos ha sido propuesta por muchos investigadores para aprovechar su elevada concentración de nutrientes y su potencial para movilizar los iones del suelo. Sin embargo, no podemos obviar los efectos negativos asociados con su alto contenido de sales minerales, bajo pH y la presencia de fenoles. Para superar los efectos fitotóxicos del esparcimiento del alpechín en los suelos, se ha sugerido el co-compostaje del alpechín con otros residuos agroindustriales (Hachicha et al., 2009). El compostaje es una de las principales tecnologías para reciclar los residuos de la industria del aceite de oliva y transformarlos en un fertilizante. Este proceso permite devolver los nutrientes a las tierras de cultivo evitando los efectos negativos que suelen observarse al aplicar estos residuos directamente al suelo (Souilem et al., 2017; Magdich et al., 2012). La aplicación de

compostaje favorece la absorción previa del alpechín en el sustrato sólido usado como agente acondicionador (residuos lignocelulósicos o estiércol) (Hachicha et al., 2009). Un ejemplo de ello sería el estudio realizado por Rigane et al. (2015), basado en co-compostaje de alpehín con estiércol de aves de corral, el cual demostró una disminución significativa del contenido de compuestos fenólicos (99%) durante el compostaje. La aplicación del compost resultante demostró mejorar las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo, principalmente los elementos fertilizantes, como calcio, magnesio, nitrógeno, potasio y fósforo. Por otro lado, la enmienda del suelo con alpechín también es conocida por su actividad antimicrobiana y sus efectos supresores contra los patógenos de las plantas (Brenes et al., 2011). Varios estudios demostraron el potencial supresivo del alpechín frente a fitopatógenos, pudiéndose considerar un material con capacidad biopesticida (Yanguí et al., 2010, 2013; Debo et al., 2011). Según los estudios disponibles, los compost pueden utilizarse en la agricultura para el control de las enfermedades de las plantas, en cuyo caso un subproducto que normalmente se considera un residuo puede ser beneficioso y útil. Sin embargo, se deben respetar algunas medidas en este caso, especialmente en lo que respecta a la dosis y el momento de uso.

4. Referencias

Abu-Lafi, S., Al-Natsheh, M. S., Yaghmoor, R., Al-Rimawi, F., 2017. Enrichment of phenolic compounds from olive mill wastewater and in vitro evaluation of their antimicrobial activities. *Evid.-Based Compl. Alt.*, 2017.

Agarwal S.K., 1998. *Environmental Biotechnology*, 1st Edition, APH Publishing Corporation, New Delhi, India. 267-289 pp.

Agnew, J.M., Leonard, J.J., 2003. The physical properties of compost. *Compost Sci. Util.*, 11(3), 238-264.

Ahmed, P.M., Fernández, P. M., Pajot, H.F., 2019. Exploitation alternatives of olive mill wastewater: production of value-added compounds useful for industry and agriculture. *Biofuel Res. J.*, 6 (2), pp. 980-994.

Ali, U., Sajid, N., Khalid, A., Riaz, L., Rabbani, M.M., Syed, J. H., Malik, R.N., 2015. A review on vermicomposting of organic wastes. *Environ. Prog. Sustain.*, 34(4), 1050-1062.

Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S., 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 52(2), 267-273.

Anastasiou, C.C., Christou, P., Michael, A., Nicolaidis, D., Lambrou, T., 2011. Approaches to olive mill wastewater treatment and disposal in Cyprus. *Environ. Res. J.*, 5 (2), 49–58.

Aramendía, M. A., Boráu, V., García, I., Jiménez, C., Lafont, F., María Marinas, J., Urbano, F.J., 1996. Qualitative and Quantitative Analyses of Phenolic Compounds by High-performance Liquid Chromatography and Detection with Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 10(13), 1585-1590.

Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gabriel, D., Gea, T., Mudhoo, A., Sánchez, A., 2009. Composting from a sustainable point of view: respirometric indices as a key parameter. *Dyn. Soil Dyn. Plant*, 3, 1-16.

Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Sayadi, S., Hamdi, M., 2009. Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63(4), 407-413.

Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F., Ozer, A., 2004. A review of waste management options in olive oil production. *Crit. Rev. Env. Sci. Tech.*, 34(3), 209-247.

Banias, G., Achillas, C., Vlachokostas, C., Moussiopoulos, N., Stefanou, M., 2017. Environmental impacts in the life cycle of olive oil: A literature review. *J. Sci. Food Agric.*, 97(6), 1686-1697.

Bento, F.M., Camargo, F.A., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.*, 96(9), 1049-1055.

Beškoski, V., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., Jovančićević, B., Vrvčić, M., 2012. Bioremediation of soil polluted with crude oil and its derivatives: microorganisms, degradation pathways, technologies. *Hem. Ind.*, 66(2), 275-289.

Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Jasionowska, R., Margherita, P., 2003. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *J. Sep. Sci.*, 26(5), 409-416.

Bollag, J.M., Bollag, W.B., 1995. Soil Contamination and the Feasibility of Biological Remediation. En: H.D. Skipper, R.F. Turco (Eds.), *Bioremediation: Science And Applications*, SSSA Special Publication, Vol. 43. Soil Science Society of America, America Society of Agronomy, Crop Science Society of America. Madison, Wisconsin, pp. 1-12.

Bouwer, E.J., Durant, N.D., Wilson, L.P., Zhang, W.X., 1998. Design considerations for *in situ* bioremediation of organic contaminants. En: G.A. Lewandowski, L.J. DeFlippi (Eds), *Biological Treatment of Hazardous Waste.*, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 287-318

Bouwer, E.J., Zehnder, A.J., 1993. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *Trends Biotechnol.*, 11(8), 360-367.

Brenes, M., García, A., De los Santos, B., Medina, E., Romero, C., De Castro, A., Romero, F., 2011. Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chem.*, 125(4), 1262-1266.

Capasso, R., Evidente, A., Scognamiglio, F., 1992. A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem. Anal.*, 3(6), 270-275.

Caputo, A.C., Scacchia, F., Pelagagge, P.M., 2003. Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Appl. Therm. Eng.*, 23(2), 197-214.

Cerrone, F., Sanchez-Peinado, M.D.M., Juárez-Jimenez, B., González-López, J., Pozo, C., 2010. Biological treatment of two-phase olive mill wastewater (TPOMW, alpeorujo): polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by *Azotobacter* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(3), 594-601.

Chartzoulakis, K., Psarras, G., Moutsopoulou, M., Stefanoudaki, E., 2010. Application of olive mill wastewater to a Cretan olive orchard: effects on soil properties, plant performance and the environment. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 138(3-4), 293-298.

Chatterjee, S., Chattopadhyay, P., Roy, S., Sen, S.K., 2008. Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments. *J. Appl. Biosci.*, 11(1), 594.

Congress, U.S., 1991. Bioremediation of Marine Oil Spills - Background Paper. Washington, DC: US Government Printing Office. <https://www.princeton.edu/~ota/disk1/1991/9109/9109.PDF> (consultado 20/08/21).

Contreras-Ramos, S.M., Alvarez-Bernal, D., Dendooven, L., 2006. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environ. Pollut.* 141(3), 396-401.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56(1), 55-114.

Cybulski, Z., Dziurla, E., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2003. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains. *Spill Sci. Technol. Bull.*, 8(5-6), 503-507.

Danellakis, D., Ntaikou, I., Kornaros, M., Dailianis, S., 2011. Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 101(2), 358-366.

Debo, A., Yangui, T., Dhouib, A., Ksantini, M., & Sayadi, S., 2011. Efficacy of a hydroxytyrosol-rich preparation from olive mill wastewater for control of olive psyllid, *Euphyllura olivina*, infestations. *Crop Prot.*, 30(12), 1529-1534.

Dean-Ross, D., Moody, J., Cerniglia, C.E., 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 41(1), 1-7.

Demicheli, M.C., Bontoux, L., 1997. Novel technologies for olive oil manufacturing and their incidence on the environment. *Fresen. Environ. Bull.*, 6 (5), 240-247.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochem.*, 48(10), 1532-1552.

Domde, P., Kapley, A., Purohit, H.J., 2007. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater-containing hydrocarbons. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 14(1), 7.

Doula, M., Kavvadias, V., Theocharopoulos, S., Kouloumbis, P., Oikonomou, D., Arapoglou, D., 2009. Environmental impacts relative to soil quality caused from the disposal of olive oil mills' wastes. Case study: A municipality in Crete, Greece. *Proceedings of 3rd AMIREG International Conference: Assessing the Footprint of Resource Utilization and Hazardous Waste Management*. Athens, pp. 84-89.

Doula, M.K., Moreno-Ortego, J.L., Tinivella, F., Inglezakis, V.J., Sarris, A., Komnitsas, K., 2017. Chapter 2 - Olive mill waste: Recent advances for the sustainable development of olive oil industry. En: C.M. Galanakis (Ed.), *Olive mill waste: Recent Advances for Sustainable Management*. Academic Press, London, U.K. pp. 29-56.

Dubey R.C., 2004. *A text book of Biotechnology*, 3rd Edition, S.Chand & Company Ltd. New Delhi, India.

Dzionic, A., Wojcieszynska, D., Guzik, U., 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electron. J. Biotechn.*, 23, 28-36.

Edwards, C.A., 1988. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. En: C.A. Edwards, E.F. Neuhauser (Eds.), *Earthworms in waste and environment*. SPB Academic Publishing, Netherlands, pp. 21-31.

El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guisresse, M., Merlina, G., Revel, J.C., Hafidi, M., 2007. Assessment of the genotoxicity of olive mill wastewater (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mut. Res.-Genet. Tox. En.*, 634(1-2), 25-31.

Ellis, B., Gorder, K., 1997. Intrinsic bioremediation: an economic option for cleaning up contaminated land. *Chem. Ind.*, (3), 95-98.

Erakhrumen, A.A., Agbontalor, A., 2007. Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. *Educ. Res. Rev-Neth*, 2(7), 151-156.

Etim, E.E., 2012. Phytoremediation and its mechanisms: a review. *Int. J. Environ. Bioenerg.*, 2(3), 120-136.

Favero, N., Costa, P., Massimino, M.L., 1991. *In vitro* uptake of cadmium by basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.*, 13(10), 701-704.

Gabriel, J., Mokrejš, M., Bílý, J., Rychlovský, P., 1994. Accumulation of heavy metals by some wood-rotting fungi. *Folia Microbiol.*, 39(2), 115-118.

Gajalakshmi, S., Abbasi, S.A., 2008. Solid waste management by composting: state of the art. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, 38(5), 311-400.

Gajalakshmi, S., Ramasamy, E.V., Abbasi, S.A., 2002. Vermicomposting of paper waste with the anecic earthworm *Lampito mauritii* Kinberg. *Indian J. Chem. Techn.*, 9, 306–311.

Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Tech.*, 26(2), 68-87.

Gertler, C., Gerdts, G., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., 2009. Microbial consortia in mesocosm bioremediation trial using oil sorbents, slow-release fertilizer and bioaugmentation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 69(2), 288-300.

Glazer, A.N., Nikaido, H., 2007. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press, New York.

Guibal, E., Roulph, C., Le Cloirec, P., 1995. Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption by fungal biomass and materials of biological origin. *Enviro. Sci. Technol.*, 29(10), 2496-2503.

Gupta, R., Mohapatra, H., 2003. Microbial biomass: an economical alternative for removal of heavy metals from wastewater. *Indian J. Exp. Biol.* 41, 945-966.

GZA GeoEnvironmental, 1998. www.gzea.com/bioremediation-bioremediation.asp. (Consultado 18/20/21).

Hachicha, S., Cegarra, J., Sellami, F., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., Ammar, E., 2009. Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark. *J. Hazard. Mater.*, 161(2-3), 1131-1139.

Harmsen, J., Rulkens, W., Sims, R.C., Ritjema, P., Zweers, A., 2007. Theory and Application of Landfarming to Remediate PAHs and Mineral Oil Contaminated Sediments: Beneficial Reuse. *J. Environ. Qual.*, 36.

Hernández, A., Mellado, R.P., Martínez, J.L., 1998. Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(11), 4317-4320.

Hess, A., Zarda, B., Hahn, D., Häner, A., Stax, D., Höhener, P., Zeyer, J., 1997. *In situ* analysis of denitrifying toluene-and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6), 2136-2141.

Hickman, Z.A., Reid, B.J., 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environ. Inter.*, 34(7), 1072-1081.

Hunt S., 1986. Diversity of biopolymer structure and its potential for ion-binding applications. In: H. Eccles, S. Hunt (Eds), Immobilization of ions by biosorption. Ellis Horwood Limited, Chichester, England, pp. 16-46.

Hytiris, N., Kapellakis, I.E., de La Roij, R., Tsagarakis, K.P., 2004. The potential use of olive mill sludge in solidification process. *Resour. Conserv. Recycl.*, 40, 129–139.

Ijah, U.J.J., 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Manage.*, 18(5), 293-299.

IOC (International olive council), 2021. World Olive Oil Fig. URL: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/12/HO-W901-23-11-2020-P.pdf> (Consultado 27/08/2021)

Iwamoto, T., Nasu, M., 2001. Current bioremediation practice and perspective. *J. Biosci. Bioeng.*, 92(1), 1-8.

Jacques, R.J., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C., Camargo, F.A., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour. Technol.*, 99(7), 2637-2643.

Jagadevan, S., Mukherji, S., 2004. Successful *in situ* oil bioremediation programmes - key parameters. *Indian J. Biotechnol.*, 3, 495 – 501.

Jogdand S.N., 1995. Environmental biotechnology, 1st Edition, Himalaya Publishing House, Bombay, India. 104-120pp.

Jong, E., Jungmeier, G., 2015. Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. En: Ashok, P., Rainer, H., Christian, L., Mohammad, T., Madhavan, N. (Eds.), Industrial Biorefineries & White Biotechnology. Elsevier, Waltham, USA, pp. 3-33.

Joo, H.S., Shoda, M., Phae, C.G., 2007. Degradation of diesel oil in soil using a food waste composting process. Biodegradation, 18(5), 597.

Justino, C.I., Pereira, R., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T.A., Panteleitchouk, T.S., Duarte, A.C., 2012. Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. Ecotoxicology, 21(2), 615-629.

Juwarkar, A.A., Singh, S.K., Mudhoo, A., 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 9(3), 215-288.

Kamaludeen, S.P.B., Arunkumar, K.R., Ramasamy, K., 2003. Bioremediation of chromium contaminated environments. Indian J. Exp. Biol., 41 (9), pp. 972-985.

Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Avramaki, C., Angelakis, A.N., 2006. Olive mill wastewater management in river basins: a case study in Greece. Agric. Water Manag., 82(3), 354-370.

Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Crowther, J.C., 2008. Olive oil history, production and by-product management. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 7 (1), 1-26.

Kapley, A., Purohit, H.J., Chhatre, S., Shanker, R., Chakrabarti, T., Khanna, P., 1999. Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically engineered microbial consortium. Bioresour. Technol., 67(3), 241-245.

Karaouzas, I., Skoulikidis, N.T., Giannakou, U., Albanis, T.A., 2011. Spatial and temporal effects of olive mill wastewaters to stream macroinvertebrates and aquatic ecosystems status. Water Res., 45(19), 6334-6346.

Kavvadias, V., Doula, M.K., Komnitsas, K., Liakopoulou, N., 2010. Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: effects on soil properties. J. Hazard. Mater., 182(1-3), 144-155.

Kavvadias, V., Elaiopoulos, K., Theocharopoulos, S., Soupios, P., 2017. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. *B. Environ. Contam. Tox.*, 98(3), 323-330.

Kelly, R.L., Liu, B. I.L.L., Srivastava, V.I.P.U.L., 1998. *Bioremediation: Principles and Practice-Bioremediation Technologies*. En: S.K. Sikdar, R.L. Irvine (Eds.), *Landfarming: A practical guide*. Technomic Publishing CO, Inc. Lancaster, Pennsylvania, USA, 223–243.

Lal, B., Khanna, S., 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J. Appl. Bacteriol.*, 81(4), 355-362.

Lee, S., Cutright, T., 1995. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *J. Clean. Prod.*, 4(3), 255.

Litchfield, C.D., 1993. *In situ* bioremediation: basis and practices. En: M.A. Levin, M.A. Gealt (Eds.), *Biotechnology of industrial and hazardous waste*. McGraw-Hill, USA. pp. 167–195.

López, M.J., 1996. Producción de biopolímeros a partir del alpechín: obtención de xantano. Tesis doctoral, Universidad de Granada.

Lukić, B., Panico, A., Huguenot, D., Fabbicino, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G., 2017. A review on the efficiency of landfarming integrated with composting as a soil remediation treatment. *Environ. Technol. Rev.*, 6(1), 94-116.

Magdich, S., Jarboui, R., Rouina, B.B., Boukhris, M., Ammar, E., 2012. A yearly spraying of olive mill wastewater on agricultural soil over six successive years: impact of different application rates on olive production, phenolic compounds, phytotoxicity and microbial counts. *Sci. Total Environ.*, 430, 209-216.

Maila, M.P., Cloete, T.E., 2004. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Rev. Environ. Sci. Bio.*, 3(4), 349-360.

McNamara, C.J., Anastasiou, C.C., O’Flaherty, V., Mitchell, R., 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 61(2), 127-134.

Mechri, B., Cheheb, H., Boussadia, O., Attia, F., Mariem, F.B., Braham, M., Hammami, M., 2011. Effects of agronomic application of olive mill wastewater in a field

of olive trees on carbohydrate profiles, chlorophyll a fluorescence and mineral nutrient content. *Environ. Exp. Bot.*, 71(2), 184-191.

Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2009. Evolution of several soil properties following amendment with olive mill wastewater. *Prog. Nat. Sci.*, 19(11), 1515-1521.

Moreno, J., Moral, R., 2008. *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa Libros, Madrid.

Mudhoo, A., Mohee, R., 2008. Modeling Heat Loss during Self-Heating Composting Based on Combined Fluid Film Theory and Boundary Layer Concepts. *J. Environ. Inform.*, 11(2).

Ndegwa, P.M., Thompson, S.A., 2001. Integrating composting and vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresour. Technol.*, 76(2), 107-112.

Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., 2006. Olive processing waste management: literature review and patent survey. *Typoshito - George Dardanos*, Athens, Greece.

Ntougias, S., Bourtzis, K., Tsiamis, G., 2013. The microbiology of olive mill wastes. *BioMed Res. Int.*, 2013.

Orive, M., Cebrián, M., Zufía, J., 2016. Techno-economic anaerobic co-digestion feasibility study for two-phase olive oil mill pomace and pig slurry. *Renew. Energ.*, 97, 532-540.

Othman, N., Juki, M.I., Hussain, N., Talib, S.A., 2011. Bioremediation a potential approach for soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons: an overview. *Int. J. Sustain. Constr. Eng. Technol.*, 2(2).

Paredes, C., Bernal, M. P., Cegarra, J., Roig, A., 2002. Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresour. Technol.*, 85(1), 1-8.

Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P., 1999. Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresour. Technol.*, 67(2), 111-115.

Park, A.J., Cha, D.K., Holsen, T.M., 1998. Enhancing solubilization of sparingly soluble organic compounds by biosurfactants produced by *Nocardia erythropolis*. *Water Environ. Res.*, 70(3), 351-355.

Pearson, R.G., 1969. Hard and soft acids and bases. *Surv. Prog. Chem.*, 5(1), 1-52.

Philip, L., Iyengar, L., Venkobachar, C., 2000. Site of interaction of copper on *Bacillus polymyxa*. *Water Air Soil Poll.*, 119(1), 11-21.

Piotrowska, A., Rao, M.A., Scotti, R., Gianfreda, L., 2011. Changes in soil chemical and biochemical properties following amendment with crude and dephenolized olive mill wastewater (OMW). *Geoderma*, 161(1-2), 8-17.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2002. *Microbiology*, 5th Edition, McGraw-Hill, New York.

Purkayastha, R.P., Mitra, A.K., 1992. Metal uptake by mycelia during submerged growth and by sporocarps of an edible fungus *Volvariella volvacea*. *Indian J. Exp. Biol.*, 30(12), 1184-1187.

Rahmanian, N., Jafari, S.M., Galanakis, C.M., 2014. Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 91(1), 1-18.

Rajendran, P., Muthukrishnan, J., Gunasekaran, P., 2003. Microbes in heavy metal remediation. *Indian J. Exp. Biol.*, 41, 935-944.

Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., Garcia-Pareja, M.P., 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 38(3-4), 283-290.

Raskin, I., Ensley, B.D., 2000. *Phytoremediation of toxic metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

Rigane, H., Chtourou, M., Ben Mahmoud, I., Medhioub, K., Ammar, E., 2015. Polyphenolic compounds progress during olive mill wastewater sludge and poultry manure co-composting, and humic substances building (Southeastern Tunisia). *Waste Manage. Res.*, 33(1), 73-80.

Rodis P.S., Karathanos V.T., Mantzavinou A., 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.*, 50(3), 596–601.

Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste manage.*, 26(9), 960-969.

Roselló-Soto, E., Galanakis, C.M., Brnčić, M., Orlie, V., Trujillo, F.J., Mawson, R., Knoerzer, K., Tiwarig, B.K., Barba, F.J., 2015. Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods, by-products and algae assisted by ultrasounds processing. Modeling approaches to optimize processing conditions. *Trends Food Sci. Tech.*, 42(2), 134-149.

Rozzi, A., Malpei, F., 1996. Treatment and disposal of olive mill effluents. *Inter. Biodeter. Biodegr.*, 38(3-4), 135-144.

Sanglimsuwan, S., Yoshida, N., Morinaga, T., Murooka, Y., 1993. Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms. *J. Ferment. Bioeng.*, 75(2), 112-114.

Sar, P., D'Souza, S.F., 2001. Biosorptive uranium uptake by a *Pseudomonas* strain: characterization and equilibrium studies. *J. Chem. Technol. Biot.*, 76(12), 1286-1294.

Sar, P., Kazy, S.K., Asthana, R.K., Singh, S.P., 1999. Metal adsorption and desorption by lyophilized *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 44(2-3), 101-110.

Sayara, T., Sarrà, M., Sánchez, A., 2010. Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *J. Hazard. Mater.*, 179(1-3), 999-1006.

Schippers, A., Glombitza, F., Sand, W., 2014. *Geobiotechnology*. Springer - Verlag, Heidelberg, Berlin.

Scott, D.C., David, W.O., 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.*, 110, 715-719.

Sierra, J., Martí, E., Montserrat, G., Cruanas, R., Garau, M.A., 2001. Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Sci. Total Environ.*, 279(1-3), 207-214.

Singh, J., Kaur, A., Vig, A. P., Rup, P.J., 2010. Role of *Eisenia fetida* in rapid recycling of nutrients from bio sludge of beverage industry. *Ecotox. Environ. Safe.*, 73(3), 430-435.

Singh, R.P., Embrandiri, A., Ibrahim, M.H., Esa, N., 2011. Management of biomass residues generated from palm oil mill: Vermicomposting a sustainable option. *Resour. Conserv. Recy.*, 55(4), 423-434.

Smith, V.H., Graham, D.W., Cleland, D.D., 1998. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, 32(21), 3386-3395.

Souilem, S., El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., Sayadi, S., Galanakis, C.M., 2017. Chapter 1 - Olive oil production sector environmental effects and sustainability challenges. En: C.M. Galanakis (Ed.), *Olive mill Waste: Recent advances for the sustainable management*, Academic Press, Elsevier Inc., pp. 1-28.

Stasinakis, A.S., Elia, I., Petalas, A.V., Halvadakis, C.P., 2008. Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *J. Hazard. Mater.*, 160(2-3), 408-413.

Straube, W.L., Nestler, C.C., Hansen, L.D., Ringleberg, D., Pritchard, P.H., Jones-Meehan, J., 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnol.*, 23(2-3), 179-196.

Strong, P.J., Burgess, J.E., 2008. Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: a review. *Bioremediat. J.*, 12(2), 70-87.

Suthar, S., Singh, S., 2008. Feasibility of vermicomposting in biostabilization of sludge from a distillery industry. *Sci. Total Environ.*, 394(2-3), 237-243.

Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., Christie, P., 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresour. Technol.*, 101(10), 3437-3443.

Tharakan, J., Tomlinson, D., Addagada, A., Shafagati, A., 2006. Biotransformation of PCBs in contaminated sludge: potential for novel biological technologies. *Eng. Life Sci.*, 6(1), 43-50.

Thassitou, P.K., Arvanitoyannis, I.S., 2001. Bioremediation: a novel approach to food waste management. *Trends Food Sci. Tech.*, 12(5-6), 185-196.

Tsagaraki, E., Lazarides, H.N., Petrotos, K.B., 2007. Olive mill wastewater. En: V. Oreopoulou, W. Russ (Eds.), *Utilisation of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Springer, New York, pp. 133-157.

Vekiari, S. A., Papadopoulou, P., Koutsaftakis, A., 2002. Comparison of different olive oil extraction systems and the effect of storage conditions on the quality of the virgin olive oil. *Grasas y Aceites*, 53(3), 324-329.

Visioli, F., Poli, A., Gall, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.*, 22(1), 65-75.

Vitolo, S., Petarca, L., Bresci, B., 1999. Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresour. Technol.*, 67, 129-137.

Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *J. Clean. Prod.*, 12(6), 603-611.

Watanabe, K., Watanabe, K., Kodama, Y., Syutsubo, K., Harayama, S., 2000. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microb.*, 66(11), 4803-4809.

Xu, Y., Lu, M., 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *J. Hazard. Mater.*, 183(1-3), 395-401.

Yan, G., Viraraghavan, T., 2001. Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass. *Bioresour. Technol.*, 78(3), 243-249.

Yangui, T., Sayadi, S., Gargoubi, A., Dhouib, A., 2010. Fungicidal effect of hydroxytyrosol-rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop Prot.*, 29(10), 1208-1213.

Zagklis, D.P., Arvaniti, E.C., Papadakis, V.G., Paraskeva, C.A., 2013. Sustainability analysis and benchmarking of olive mill wastewater treatment methods. *J. Chem. Technol. Biot.*, 88(5), 742-750.

Zenjari, B., Nejmeddine, A., 2001. Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: laboratory experiments. *Agronomie*, 21(8), 749-755.

Zhang, X., Xia, H., Li, Z., Zhuang, P., Gao, B., 2010. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. *Bioresour. Technol.*, 101(6), 2063-2066.

Zirehpour, A., Jahanshahi, M., Rahimpour, A., 2012. Unique membrane process integration for olive oil mill wastewater purification. *Sep. Purif. Technol.*, 96, 124-131.

V. Hipótesis y objetivos

Tal y como se ha descrito en el apartado de introducción, el alpechín es el principal residuo de la agroindustria del aceite de oliva y la disposición de este residuo en balsas para su evaporación natural constituyó una de las principales alternativas para su gestión durante la década de los 80, cuando la mayoría de las almazaras contaban con el sistema de extracción a tres fases. En estas balsas se produce la evaporación del componente acuoso del alpechín y la concentración del resto de componentes, entre los que destacan, por sus efectos fitotóxicos y antimicrobianos, los compuestos fenólicos. Por lo tanto, el resultado final del uso de estas balsas es la generación de un sedimento o lodo recalcitrante. Además, este acúmulo de alpechín puede ocasionar impactos negativos en los alrededores de las balsas, no sólo visuales, puesto que, la mayoría de ellas están mal dimensionadas o no impermeabilizadas y se producen filtraciones que afectan negativamente al ecosistema colindante.

Por lo tanto, se hace necesario implementar técnicas que conduzcan a la gestión adecuada y respetuosa con el medioambiente de los lodos de alpechín, permitiendo principalmente eliminar su carácter contaminante. Para ello, las técnicas de biorremediación *in situ* constituyen la mejor opción debido a su sostenibilidad desde el punto de vista económico y ambiental. La descontaminación de sedimentos de alpechín mediante estrategias de biorremediación requiere el uso de organismos que sean capaces de degradar los compuestos fenólicos que son los principales responsables de su carácter fitotóxico y antimicrobiano. El propio residuo puede ser una fuente idónea de microorganismos adaptados a ese entorno y, por tanto, con potencial para biotransformar el material que lo constituye. En esta Tesis Doctoral se aplican cuatro técnicas de biorremediación *in situ*, es decir, implementadas en la misma balsa de evaporación en la que se encuentran los lodos: landfarming, compostaje, vermicompostaje y fitorremediación. En cada caso, además, se estudia el efecto de la bioaugmentación con cepas aisladas a partir del propio lodo. Si se plantea el desarrollo de estas estrategias de biodescontaminación *in situ*, cabe preguntarse: ¿Cuál de las técnicas resulta más eficaz para tratar los lodos de alpechín? ¿Serán estas técnicas eficaces por si solas en la eliminación de los compuestos recalcitrantes del alpechín simplemente bioestimulando los microorganismos ya presentes en dicho residuo? o, por otra parte, ¿Se puede acelerar el efecto descontaminante de estas técnicas biorremediadoras tras la incorporación de

microorganismos seleccionados por sus capacidades para degradar los contaminantes mediante su bioaumentación?

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue **el estudio de tratamientos de biorremediación *in situ* como alternativa sostenible para la gestión de lodos o sedimentos resultantes del acúmulo de alpechín en balsas de evaporación.**

Para la consecución del objetivo global se propusieron los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Determinar las características contaminantes de los lodos presentes en balsas de evaporación de alpechín y la extensión de la contaminación provocada por los mismos, así como su impacto sobre la microbiota.

Objetivo 2. Aislar, seleccionar y caracterizar microorganismos con actividad biodescontaminante del alpechín para su empleo en estrategias de bioaumentación.

Objetivo 3. Evaluar la eficacia de estrategias de biorremediación, en presencia o ausencia de inóculo microbiano, para la biodescontaminación *in situ* de lodos de alpechín en balsas de evaporación.

VI. Fases experimentales

Las fases experimentales de la presente Tesis Doctoral se ilustran en la Figura 10. Dichas fases están enlazadas secuencialmente con los objetivos específicos planteados en el apartado anterior, cuyo desarrollo se ha plasmado en cuatro artículos científicos, 3 de ellos publicados en revistas indexadas y un cuarto enviado para su revisión, incluidos en el Capítulo VII. A continuación, se resumen brevemente las fases experimentales.

Este trabajo se desarrolló en un complejo de balsas de evaporación que ocupa una superficie total de 5 ha ubicado en el municipio de Mora (Toledo, España) (39°40' 07.4" N 3°49' 40.2" W), constituido por 8 balsas de evaporación de alpechín. Estas balsas se construyeron en 1982 y estuvieron operativas para la disposición del alpechín hasta 2006. Desde entonces se encuentran en desuso y acumulan cantidades variables de lodos, dependiendo de la balsa en cuestión.

El trabajo se estructuró en tres fases, de las cuáles las dos primeras se realizaron de forma paralela, tal y como sigue:

- Fase 1. Estudio del estado inicial del área contaminada: En la primera fase del trabajo se estudió el estado inicial del área contaminada y el alcance de dicha contaminación, así como el análisis de los recursos biológicos disponibles en el área.

Para la determinación del estado inicial y caracterización de los materiales contenidos en las balsas, se tomaron muestras georreferenciadas, y se realizó un amplio espectro de determinaciones biológicas, físicas, físico-químicas y químicas. Se emplearon como variables principales en el muestreo cada balsa, de forma individual, y la profundidad de la muestra. De esta forma se obtuvieron dos perfiles en cada balsa, superficial y profundo. Este estudio inicial ofreció información relevante para la selección de las estrategias más adecuadas para la biorrecuperación y restauración de la zona contaminada. Los resultados de estos estudios se incluyen en el Capítulo 1 del apartado VII.

- Fase 2. Aislamiento de microorganismos degradadores de alpechín: En paralelo al estudio descrito en la fase 1, se tomaron muestras de lodos de las balsas para la búsqueda selectiva de microorganismos con capacidad para degradar los componentes más contaminantes del alpechín.

Partiendo de la premisa de la posible potencialidad metabólica característica de la comunidad microbiana autóctona de los lodos de alpechín, necesaria para poder subsistir en un ambiente con agentes contaminantes, tales como los compuestos fenólicos, se realizó un rastreo selectivo, en las muestras de dichos lodos, de microorganismos capaces de metabolizar estos contaminantes. Posteriormente se evaluó *in vivo* la capacidad de dichos microorganismos seleccionados para biodescontaminar el alpechín mediante su inoculación en las estrategias de biorremediación *in situ* aplicadas, como el compostaje. Los resultados de estos ensayos se incluyen en el Capítulo 2 del apartado VII.

- Fase 3. Desarrollo de las estrategias de biorremediación: En la última fase, gracias a la información obtenida sobre el área contaminada, se seleccionan las estrategias adecuadas para su biorremediación, entre las cuáles se encuentra el uso de los recursos microbianos aislados en la fase 2. Se tomaron muestras periódicas de cada estrategia para estudiar la eficacia de cada una de ellas mediante el análisis de parámetros de toxicidad, funcionalidad y calidad o madurez del material final.

Para seleccionar el tratamiento *in situ* más eficaz para la biorremediación de suelos de balsa de alpechín, se desarrollaron estrategias de biorrecuperación en unidades demostrativas que se construyeron en una de las balsas del complejo de balsas de evaporación Mora (Toledo). Se desarrollaron 4 estrategias, landfarming, compostaje, vermicompostaje y fitorremediación, que se realizaron por duplicado. Por otro lado, para evaluar, a su vez, el efecto de la estrategia de bioaumentación con el consorcio microbiano previamente seleccionado (Objetivo 2) por su potencial en la degradación de los agentes contaminantes del alpechín, dicho consorcio se incorporó mediante inoculación en una de cada réplica de estrategia de biorremediación aplicada. Los resultados de estos experimentos se incorporan en el Capítulo 4, para la comparativa de la eficacia biorremediadora de las estrategias implementadas y el efecto de la bioaumentación, y el Capítulo 3 para el estudio detallado de los procesos de compostaje y vermicompostaje, así como de los productos obtenidos.

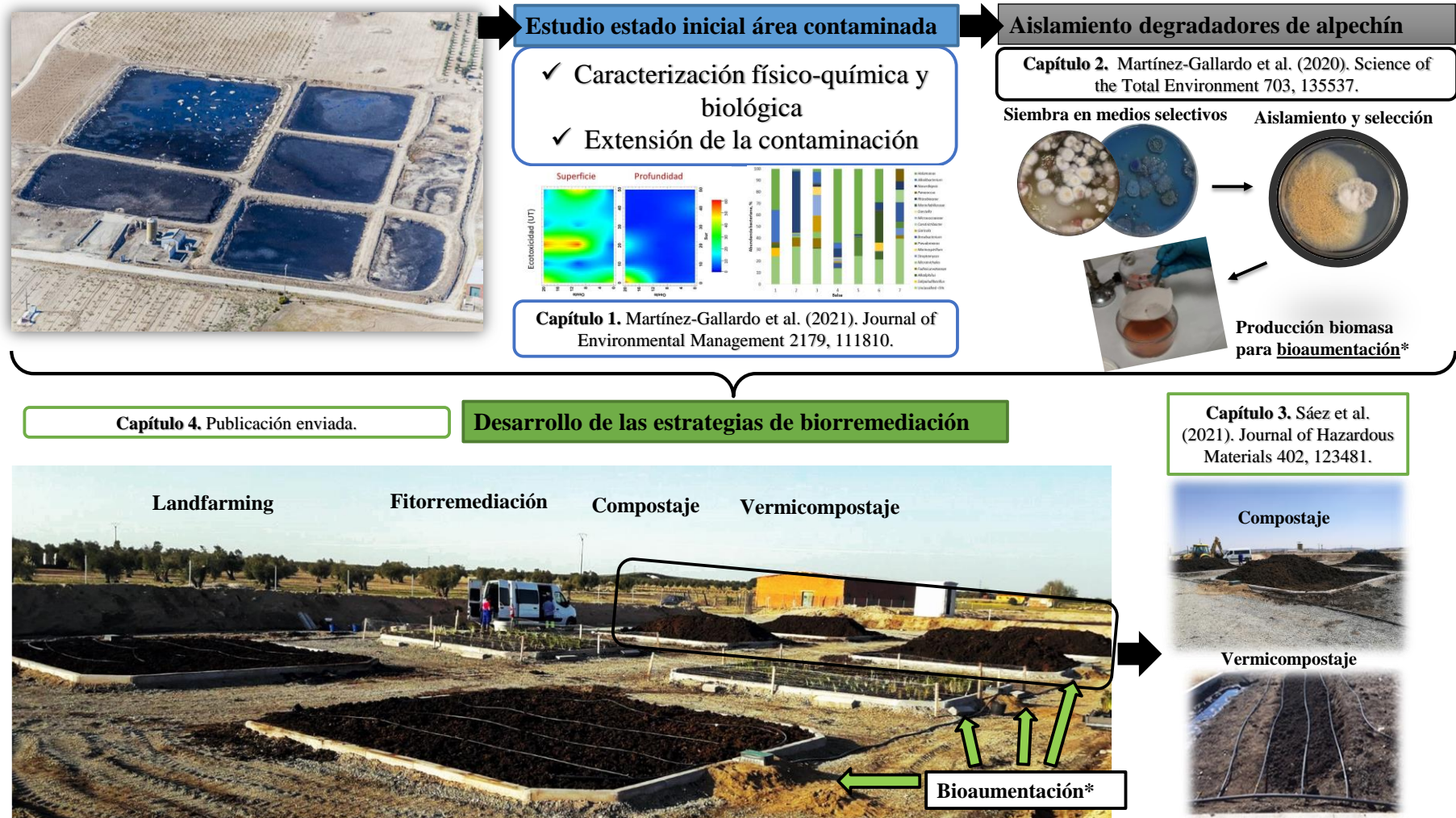


Figura 10. Diseño Experimental.

VII. Resultados

A continuación, se muestran los resultados de esta Tesis Doctoral recopilados en los manuscritos correspondientes a tres artículos publicados en revistas Q1 y un último artículo en estado de revisión. Los artículos se encuentran, a su vez, agrupados en cuatro capítulos relacionados consecutivamente con los tres objetivos de la presente Tesis Doctoral (Objetivo 1 con Capítulo I, Objetivo 2 con Capítulo II y Objetivo III con Capítulos III y IV). Cada artículo incluido ha sido adaptado al formato de la presente Tesis Doctoral.

- **Capítulo 1:**

Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., López-González, J.A., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., Pérez-Murcia, M.D., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J., 2021. Microbial communities of the olive mill wastewater sludge stored in evaporation ponds: The resource for sustainable bioremediation. *J. Environ. Manage.* 279, 111810.

- **Capítulo 2:**

Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J., 2020. Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through *in situ* composting assisted by bioaugmentation. *Sci. Total Environ.* 703, 135537.

- **Capítulo 3:**

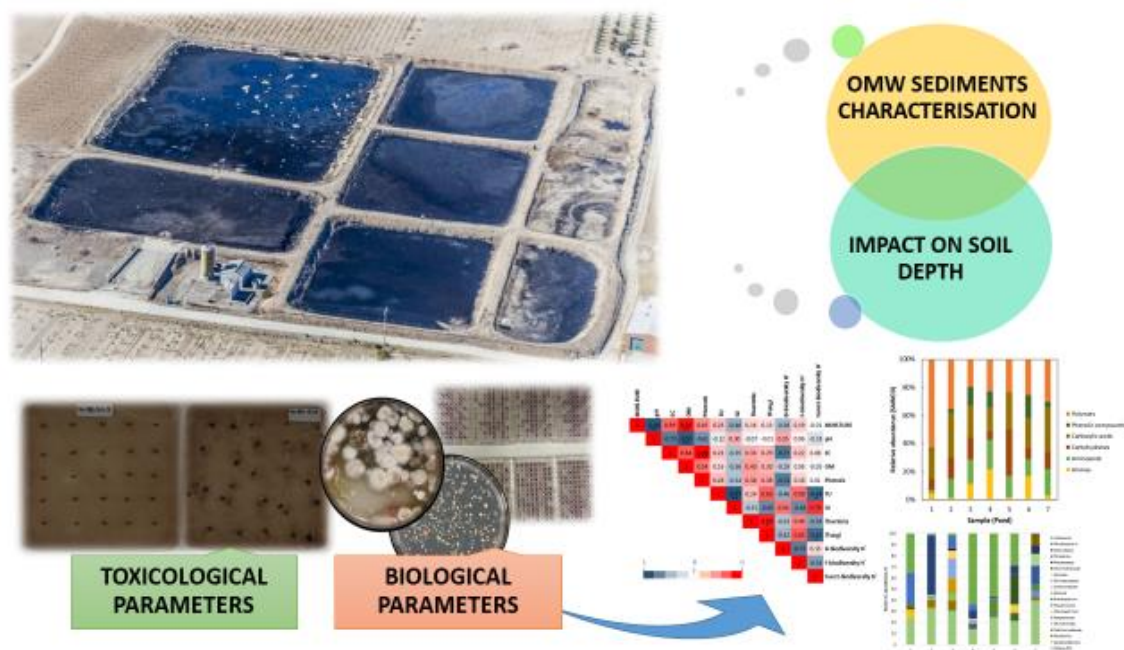
Sáez, J.A., Pérez-Murcia, M.D., Vico, A., Martínez-Gallardo, M.R., Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., Bustamante, M.A., Sánchez-Hernández, J.C., Moreno, J., Moral, R., 2021. Olive mill wastewater-evaporation ponds long term stored: Integrated assessment of *in situ* bioremediation strategies based on composting and vermicomposting. *J. Hazard. Mater.* 402, 123481.

- **Capítulo 4:**

Martínez-Gallardo, M.R., Jurado, M.M., López-González, J.A., Toribio, A., Suárez-Estrella, F., Sáez, J.A., Moral, R., Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., Organic residues and bioaugmentation for the *in situ* biorecovery of olive mill wastewater sludge stored in disposal ponds: comparison of bio-treatments. *Enviado: Waste Management*

Capítulo 1. Estudio del estado inicial del área contaminada por alpechín

Graphical Abstract



Microbial communities of the olive mill wastewater sludge stored in evaporation ponds: the resource for sustainable bioremediation

María R Martínez-Gallardo, María J López, Juan A. López-González, Macarena M Jurado, Francisca Suárez-Estrella, María D. Pérez-Murcia, José A. Sáez, Raúl Moral, Joaquín Moreno

Publicado en Journal of Environmental Management (2021), 279, 111810. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111810

Resumen: El alpechín es un residuo líquido procedente de la industria del aceite de oliva caracterizado por sus efectos contaminantes. Uno de los principales métodos aplicados para su gestión ha sido su almacenamiento en estanques de evaporación al aire libre y sin protección, donde la fase acuosa se evapora y la fase sólida se va acumulando en forma de sedimentos. Este estudio compara las características de los lodos de alpechín almacenados durante largo tiempo en estanques de evaporación y evalúa su impacto en la capa de suelo subyacente. Se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos, bioensayos de toxicidad y la caracterización completa de la comunidad microbiana. La extensión de los efectos contaminantes se evaluó mediante el análisis de la toxicidad, el carbono de la biomasa microbiana y la respiración microbiana. Para predecir la distribución espacial de la toxicidad se emplearon herramientas geoestadísticas. El contenido en materia orgánica y polifenoles, además de los niveles de toxicidad, determinan las variaciones entre los lodos de alpechín y tienen un alto impacto en la microbiota que contienen. La comunidad microbiana presente en los lodos se caracterizó por su abundancia, diversidad y funcionalidad. Sin embargo, la biodegradabilidad de los lodos se vio dificultada por los altos niveles de toxicidad. Los valores de toxicidad y abundancia microbiana eran mayores en la superficie de las balsas que en la capa de suelo, lo que revela una reducción del flujo de lixiviación. La potencial microbiota autóctona podría ser bioestimulada mediante la aplicación de tratamientos biológicos sostenibles y viables para favorecer la biorremediación de los lodos de alpechín. Estos resultados abren la posibilidad de resolver la preocupación ambiental que provoca su almacenamiento en escenarios similares, habituales en los países productores de aceite de oliva.

Abstract

Olive Mill Wastewater (OMW) is a polluting residue from the olive oil industry. It is usually stored in open-air unprotected evaporation ponds where their sediments accumulate. This study compares the characteristics of OMW sludges stored for long-time in evaporation ponds and assesses their impact on the underlying soil layer. Physicochemical parameters, toxicity bioassays, and full characterization of the microbial community were analyzed. The extension of the polluting effects was assessed by analysis of toxicity, microbial biomass carbon, and respiration. Geostatistics was used to predict their spatial distribution. Organic matter and polyphenol content besides toxicity levels determine variations between OMW sludges and have a high impact on the microbiota they contain. The microbial community was abundant, diverse, and functionally active. However, the biodegradability of the sludges was hindered by the toxicity levels. Toxicity and biomass carbon were higher on the surface of the ponds than in the soil layer revealing a reduced leach flow and depletion of contaminants. The natural microbiota might be biostimulated by means of applying sustainable and feasible biological treatments in order to favor the OMW sludges bioremediation. These results open up the possibility of solving the environmental concern caused by its storage in similar scenarios, which are common in olive oil-producing countries.

Keywords: Metagenomics; Ecotoxicity; Phytotoxicity; Biolog Ecoplate; Kriging; Total bacteria and fungi.

1. Introduction

The olive oil-processing industry has prominent socioeconomic importance that is progressively growing. The average yearly production of olive oil worldwide is around 3.4 million tons, 98% of which are produced in the Mediterranean basin (Souilem et al., 2017). This agro-food sector generates large amounts of solid and liquid residues that should be properly managed to avoid environmental contamination. The characteristics and type of these residues greatly depend on the olive oil extraction system used (Kavvadias et al., 2017). Traditional press and three-phase decanter (3P-D) systems produce two residues: liquid olive mill wastewater (OMW) and solid olive pomace (OP). The 3P-D was introduced in the 70s in the olive oil industry and it was widely adopted up to the 90s when a more efficient olive oil extraction process was developed, consisting of a two-phase decanter (2P-D). This system produces only one semisolid residue as a mixture of the liquid and solid fraction of the olive. Despite the 3P-D is not used as much as before, it is still employed in many countries and large quantities of over 30 million m³ of OMW are generated per year, whose management remains a challenge today (Souilem et al., 2017).

OMW is a liquid emulsion with a strong odor and dark brown color, which is composed of 50-94% water, 0.4-2.5% mineral salts, and 4-16% organic matter (Paredes et al., 1999). Regarding the organic fraction, phenolic compounds (2-5%) constitute the most recalcitrant fraction of this effluent, and they are also the main responsible for the antimicrobial and phytotoxic effects of OMW (Babić et al., 2019). These phenolic compounds include simple molecules such as phenolic acids, i.e. tyrosol or hydroxytyrosol, and highly polymerized compounds such as oleuropein (Dermeche et al., 2013).

The most common method for the OMW disposal has been its accumulation in open-air shallow evaporation ponds where the water evaporates during the hottest period of the year and the OMW sediments remain as a sludge up to the next olive harvest season when the ponds are filled again with OMW (Kavvadias et al., 2017). The number of OMW evaporation ponds throughout the Mediterranean basin has increased over time because this disposal method has been widely implemented (Jarboui et al., 2010; Komnitsas et al., 2016). However, it has many drawbacks, the most important being the contamination of the surroundings of the ponds, i.e. soil and groundwater (Kavvadias et

al., 2017). Most research dealing with OMW sludge characterization and its impact in the surrounding soils focus on the chemical and physicochemical analysis (Abid et al., 2006; Kavvadias et al., 2017; Komnitsas et al., 2016) while the biotic component is scarcely considered. Such studies are important since they provide valuable information that would help to design future *in situ* bioremediation strategies. Recent studies proposed the treatment of OMW sludges in the corresponding ponds by composting (Martínez-Gallardo et al., 2020) or vermicomposting (Sanchez-Hernandez et al., 2020). The correct application of such techniques requires the knowledge of both the characteristics of the OMW sludges, especially the potential response of the biotic component, and the analysis of the extent of the contamination produced by them when stored in unprotected ponds.

In this study, we compare the characteristics of different OMW sludges stored for a long time in non-waterproofed evaporation ponds and assess their impact in the soil beneath the ponds. For these purposes, we focus on the biotic component as the key driver to explain differences among OMW sludges and toxic effects. This study provides one of the more in-deep analysis of the microbial community of such complex environment up to date that will help to design bioremediation strategies in OMW evaporation ponds.

2. Material and Methods

2.1. Study area and sampling

The study was performed in OMW evaporation ponds located in the municipality of Mora (Toledo, Spain) (39°40' 07.4" N 3°49' 40.2" W). The OMW disposal facility covers a total area of 52,440 m² and includes eight open-air evaporation ponds (Fig. 1). This facility was used for the disposal of OMW from 1982 to 2007, when it was closed down. The evaporation ponds were constructed by using native soil and simple engineering without impermeable membranes or other protective media, except for the most recently built pond 8 (Fig. 1). The ponds are connected by underground channels, which allowed OMW drainage from the discharge point in pond 7 to the other ponds based on flow. Currently, only the waterproofed pond 8 has liquid OMW while the other ponds contain OMW sludges having different levels of moisture. The study was focused on ponds filled with OMW sludges, i.e. ponds 2 to 7. Pond 1 mostly held sandy soil material with no sludge on it but just one small spot of concentrated sticky OMW at the pond border. A sample from this concentrated OMW was taken exclusively for microbial

community and toxicity effects analysis as the reference of the harshest conditions. For the analysis of OMW sludge, representative composite sludge samples (~ 5 kg) were taken from four to eight different points of the ponds at two depths, covering nearly the total sludge column length. These were pooled, thoroughly mixed, and split into three replicates that were subjected to analysis.

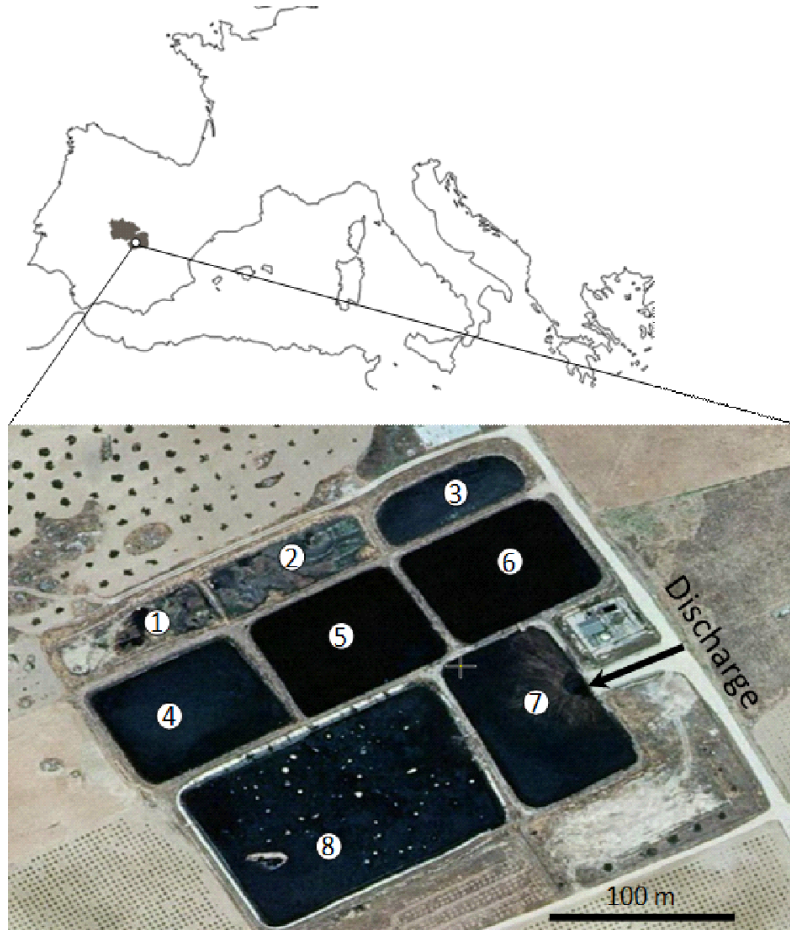


Figure 1. OMW evaporation ponds located in Mora Municipality (Toledo, Spain). The area includes eight evaporation ponds that are numbered. The study focuses on ponds 1 to 7 that contain OMW sediments/sludge. Pond 7 was the OMW discharge pond. The surfaces are as follows: 2,400 m² Ponds 1 to 3; 4,600 m² Ponds 4 to 6; and 5,500 m² Pond 7. (Modified from Google Image).

A detailed analysis of the distribution of sludge characteristics at surface and subsurface up to the soil level was performed in pond 2. Samples (~ 500 g) were collected from a grid of 18-points of the OMW sludge layer (0-45 cm) and the soil layer underneath (45-90 cm). An integrated sample of agricultural soil taken from 20 points located in two concentric circles of 100 m and 250 m from the evaporation ponds was used as a reference (undisturbed soil) and named as surrounding agricultural soil (SAS).

All samples were kept refrigerated during transportation to the laboratory. Fresh samples were used for microbial counts, moisture, and pH analysis. For the other analytical methods, the samples were stored at -20°C or -80°C in the case of metagenomics, until analysis. All results were expressed on a dry weight basis.

2.2. Analytical methods

2.2.1. Chemical and physicochemical analysis

The dry matter of the samples was determined after 24 h at 105°C . The total organic matter content (OM) was determined by weight loss on ignition at 550°C for 3.5 h. pH and electrical conductivity were analyzed in a 1:10 (w/v) water extract. Polyphenolic compounds were measured at 765 nm using the Folin-Ciocalteu (Beltrán et al., 1999) with Gallic acid standard.

2.2.2. Phytotoxicity and ecotoxicity analysis

Phytotoxicity was evaluated by the analysis of germination of *Lepidium sativum* seeds, according to Zucconi et al. (1985) with slight modifications. Briefly, a 1/10 (w/v) filtered ($0.45\ \mu\text{m}$) aqueous extract (4 mL) was added to filter paper in 12 x 12 cm sterile square plates and 25 seeds of *L. sativum* were placed in the filter. Plates with distilled water were used as control. For each sample, four replicate plates were used. After incubation at 25°C for 48 h in the dark, the number of germinated seeds and the length of the root were measured. The Germination Index (GI) was expressed as percentage (GI %) with respect to the control as follows: $\text{GI} = [(\text{Gs} \% \times \text{Ls}) / (\text{Gdw} \% \times \text{Ldw})] \times 100$. Where: Ls: Length of roots (mm) in presence of the sample; Gs: Number of seeds in the presence of the sample that germinated; Ldw: Length of roots (mm) in seeds treated with water (control); Gdw: Number of seeds treated with water (control) that germinated.

Ecotoxicity was determined using the bioluminescence inhibition test of the bacterium *Aliivibrio fischeri* (formerly *Vibrio fischeri*) according to Jarque et al. (2016). The Aboatox kit (kit 1243-500 BioTox; Aboatox, Finland) was used following the protocol established for the reconstitution of *A. fischeri*. Luminoskan ascent luminometer (Thermo Fisher Scientific, USA) was used for luminescence measurement. The concentration of the sample that causes a 50% decrease in the light emitted by the *A.*

fischeri (EC50) was calculated using regression equations. Finally, the toxicity units (TU) were calculated according to the expression $TU = [1 / (EC50)] \times 100$.

2.2.3. Microbial analysis: counts, taxonomic and functional biodiversity

Total and polyphenol-degrading culturable bacteria and fungi were quantified. Ten-fold serial dilutions were prepared from a 1/10 (w/v) dilution of fresh sample in sterile saline solution (0.9% w/v NaCl) and spread out on specific culture media for each microbial group. Plate Count Agar (PCA) (Panreac, Spain) and Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RB) (Panreac, Spain) were used for total bacteria and fungi colony counts, respectively. Polyphenol-degrading microorganisms were count as colonies surrounded by a brown halo in tannic acid (Sigma) (0.5% w/v) supplemented PCA and Potato Dextrose Agar (PDA) (Panreac), for bacteria and fungi respectively. All plates were incubated at 30 °C for 48 h (bacteria) or 96 h (fungi). Colony forming units (CFU) were count and the results were expressed as log CFU g⁻¹ dry weight.

The taxonomic bacterial and fungal biodiversity was carried out by metagenomic analysis. DNA from samples (~1 g) was extracted by using the DNeasy PowerSoil DNA isolation kit (Qiagen, Germany). For fungi, the complete ITS2 region (around 300 bp) was amplified using the primers ITS86F (5' GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA 3') and ITS4 (5' TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). For bacteria, a fragment of the bacterial 16S rRNA gene (around 460 bp) was amplified using the primers Bakt 341F (5' CCT ACG GGN GGC WGC AG 3') and Bakt 805R (5' GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 3'). In both cases, the Illumina primer sequences were attached to their 5' ends. PCRs were carried out with 2.5 µL DNA template, 0.5 µM primers, 12.5 µL Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech, Portugal), and ultrapure water up to 25 µL. The PCR reaction was performed as follows for fungal DNA: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 49 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The PCR for bacterial DNA was as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 25 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min. The oligonucleotide indices required for multiplexing different libraries in the same sequencing pool were attached in a second PCR round with identical conditions but only 5 cycles and 60 °C as the annealing temperature. Libraries were purified using the Mag-Bind RXNPure Plus magnetic beads

(Omega Biotek, USA). Then, they were grouped in equimolar amounts and sequenced in a MiSeq PE300 (Illumina, USA) by AllGenetics (La Coruña, Spain).

Functional biodiversity was determined by analyzing the physiological profile at the community level using Biolog EcoPlate™ microplates (Biolog, USA) according to Feigl et al. (2017) with some modifications. Fresh sample (2 g) was suspended in 18 mL sterile saline solution and diluted up to 10^{-3} under sterile conditions. From this dilution, 150 μ L were pipetted into each well of the Biolog EcoPlate™ microplate and incubated at 25 °C for 48 h. After incubation, the optical density (OD) at 590 nm was determined by EON microplate spectrophotometer (Biotek, USA). The optical density or color development (ODi) of each well was corrected with the control well (water). The corrected ODi values and number of substrates $N=31$ were used to calculate: functional richness ($R = \text{sum of the number of cells where } ODi \geq 0.15$); functional activity intensity as Average Well Color Development ($AWCD = \sum ODi / N$); functional biodiversity as Shannon index ($H' = -\sum p_i \ln(p_i)$, where $p_i = ODi / \sum ODi$), and Shannon evenness ($E = H' / \ln R$). The results were also expressed as substrate average well color development (SAWCD) for each of substrate categories (Sala et al., 2010).

2.2.4. Respiration indices and microbial biomass carbon

The respiration indices were determined according to Adani et al. (2006) by using the respirometer described by Ponsá et al. (2010). The analysis was performed by incubating 150 g of sample (60% moisture) in a 500 mL bottle in a water bath at 37 °C for 4 days. A constant airflow was supplied and the oxygen in the exhaust gas was measured. Two respiration indices were calculated according to Ponsá et al. (2010): Dynamic Respiration Index (DRI) and Cumulative Oxygen Consumption (AT4). DRI, expressed as g of oxygen consumed per kg of organic matter (OM) and per hour ($\text{g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ OM h}^{-1}$), was calculated from the average value of oxygen consumed during 24 h of maximal biological activity. AT4, expressed as g of oxygen consumed per kg of organic matter ($\text{g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ OM}$), was determined from cumulative oxygen consumption over four days after overcoming the lag phase. Microbial biomass carbon (C_{bio}) was evaluated by the fumigation-extraction method according to Vance et al. (1987).

2.3. Bioinformatics and data analysis

For metagenomic data analysis, the Illumina paired-end raw data contained the demultiplexed FASTQ files, i.e. forward (R1) and reverse (R2) reads with their quality scores sorted by sample. The indices and sequencing primers were deleted during the demultiplexing step. The quality of the demultiplexed FASTQ files was verified by FastQC software (Andrews, 2010). Paired-end assembly of the forward and reverse reads was performed with FLASH. CUTADAPT software 1.3 was employed to delete sequences below 300 nt that were not in the PCR. FASTQ files were checked using QIIME v1.9.0. The sequences were quality-filtered with a Phred score of 20 quality threshold and the Chimeric sequences were deleted using the UCHIME algorithm implemented in VSEARCH, with a reference based on chimera detection using Silva Database (Quast et al., 2013). The sequences were taxonomically assigned using the open-reference approach in QIIME. The operational taxonomic units (OTU) picking was run using the Silva Database and each OTU was assigned to a microbial taxon using the UCLUST algorithm with a confidence threshold of 97%. Singletons and OTUs with less sequence than 0.005% of the total were excluded from the analysis. OTUs of each sample with low abundance (below 0.1%) were removed to correct the index-jumping phenomenon. Alpha diversity indices (i.e., ACE, Chao1, Shannon, and Simpson) were calculated from rarefied samples using QIIME.

For the analysis of physicochemical, toxicity, and microbiological data, all measurements were carried out at least in triplicate, and data are presented as the mean. The Shapiro-Wilk test was performed for normality testing of the datasets. Box-Cox transformation was performed to ensure the assumption of parametricity when required, the transformed data were converted using back transformation into the original values for representation. The significance level of $p < 0.05$ was used for all statistical analyses. Analysis of variance (ANOVA) and post hoc multiple comparison tests (Least Significant Difference Fisher Test) were performed to compare mean values for the different factors analyzed. To identify the relationship between physicochemical, toxicity, and microbiological parameters, correlation analysis and principal component analysis were performed. Geostatistical mapping was performed using the method of ordinary kriging with an omnidirectional variogram that was used to construct spatial distribution maps in the OMW sludge and soil layers. All data analyses were performed using Statgraphics Centurion 18 (StatPoint Technologies Inc., Virginia, USA).

3. Results and discussion

3.1. Characteristics of OMW sludges

3.1.1. Physicochemical parameters

Table 1 shows moisture, pH, electrical conductivity (EC), organic matter (OM), and total polyphenol content of OMW sludges from the ponds 2 to 7. Pond 1 was excluded for these analyses because it lacked the sludge layer. According to moisture, pH, and OM content, there were two types of OMW sludges: mineral alkaline dry sludges from ponds 2 and 3, and organic neutral moist sludges from ponds 4 to 7. These differences are likely due to the suspended material stratification when the evaporation ponds were active (Fig. 1). Ponds nearby discharge point (ponds 4 to 7) received more OMW sediment and thus have more organic matter than the ponds faraway (ponds 1 to 3). Besides, mineral materials from ponds 2 and 3 could have been subjected to lesser OMW filling events and more mineralization of sludge than the material from the other ponds. This may explain the alkaline values of sludge from these ponds, which were far higher than the pH values of fresh OMW, around 4-5.5 (Paredes et al., 1999). It is known that the mineralization of OMW leads to an increase of pH (Kavvadias et al., 2017). Also, it can be a consequence of sludge amendments with calcium or sodium hydroxide, which is a common practice to ameliorate odor release from ponds (Ntougias et al., 2013). Other parameters that differentiate the OMW sludges were EC and polyphenol content. The material from the discharge pond 7 together with those of ponds 2 and 3 had low values of both EC (2-5 mS cm^{-1}) and polyphenol content (5-21 g kg^{-1}) in comparison to those of ponds 4 to 6 (EC 13-15 mS cm^{-1} and polyphenol content 38-49 g kg^{-1}). Fresh OMW has EC usually high (around 13 mS cm^{-1}) (Haouache and Bouchatela, 2016) and its polyphenols content ranges between 0.1 to 4 g kg^{-1} (Babić et al., 2019). The low values of EC in ponds 7, 2, and 3 could be explained by a washing effect upon rainfall episodes combined with the dynamic of water flow in the ponds (Kavvadias et al., 2017). Total phenols in fresh OMW are far lower than the values obtained in this work for most of the sludges with high moisture and organic matter load, which were enriched in those compounds. This supports the fact that recalcitrant compounds would concentrate over time in stored OMW sludge.

Table 1. Physicochemical characteristics of OMW sludges from the evaporation ponds.

Sample (Pond)	Moisture (%)	pH	Electrical conductivity (mS cm ⁻¹)	Organic matter (%)	Polyphenol content (g kg ⁻¹)
2	18.2 a	9.7 a	2.7 a	12.7 a	4.68 a
3	16.1 a	9.5 a	5.3 b	38.5 b	20.67 b
4	49.7 c	6.5 b	13.3 c	69.2 c	43.31 c
5	55.7 c	7.1 b	12.9 c	81.6 d	38.44 c
6	40.3 b	6.9 b	15.3 c	66.6 c	49.41 c
7	54.5 c	6.7 b	5.3 b	81.9 d	9.90 a
	***	***	***	**	***
LSD	7.8	0.6	1.7	6.7	3.1

Average values (n=3) within columns with different letters denote a statistically significant difference based on Fisher's LSD paired post hoc comparisons at 95% confidence level. LSD (Least Significant Difference) interval and significance of ANOVA test ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 are shown.

3.1.2. Toxicity

In general, the toxicity of sludges both on plants (phytotoxicity) or microorganism model *A. fischeri* (ecotoxicity) followed a similar pattern (Fig. 2). According to them, the samples can be classified into three levels of toxicity: highly toxic (ponds 1, 4, and 5), moderately toxic (ponds 2 and 3), and low toxic (ponds 6 and 7). The average TU value was 35 and oscillated from 9 in pond 6 to values higher than 50. These results agree with previous studies on fresh OMW toxicity using the same bioassay (Amaral et al., 2012; Babić et al., 2019). The phytotoxicity was also variable among the sludges, but all exhibited phytotoxic values. The lowest GI value (20%) (higher phytotoxicity) was obtained in the sample taken from pond 1, that together with sludges from ponds 4 and 5 (GI>50%) gave GI values considered highly phytotoxic. Polyphenol compounds content in addition to high salinity (EC) influence OMW toxicity (Babić et al., 2019). In fact, samples with the lowest CE and polyphenol content from ponds 2, 3, and 7 were the less toxic (lower UT and higher GI values) while those from ponds 4 and 5 that had high CE and polyphenol content showed high toxicity levels. However, that was not the case for OMW sludge from pond 6, which although having the highest EC and polyphenol content, was even less toxic than those from ponds 2 and 3. This indicates that toxicity is much more complex than previously considered and analyzing phenolic compounds and

EC, though being good indicators of the potential toxic effect of materials, are not by themselves good enough to predict the impact of a specific OMW sludge.

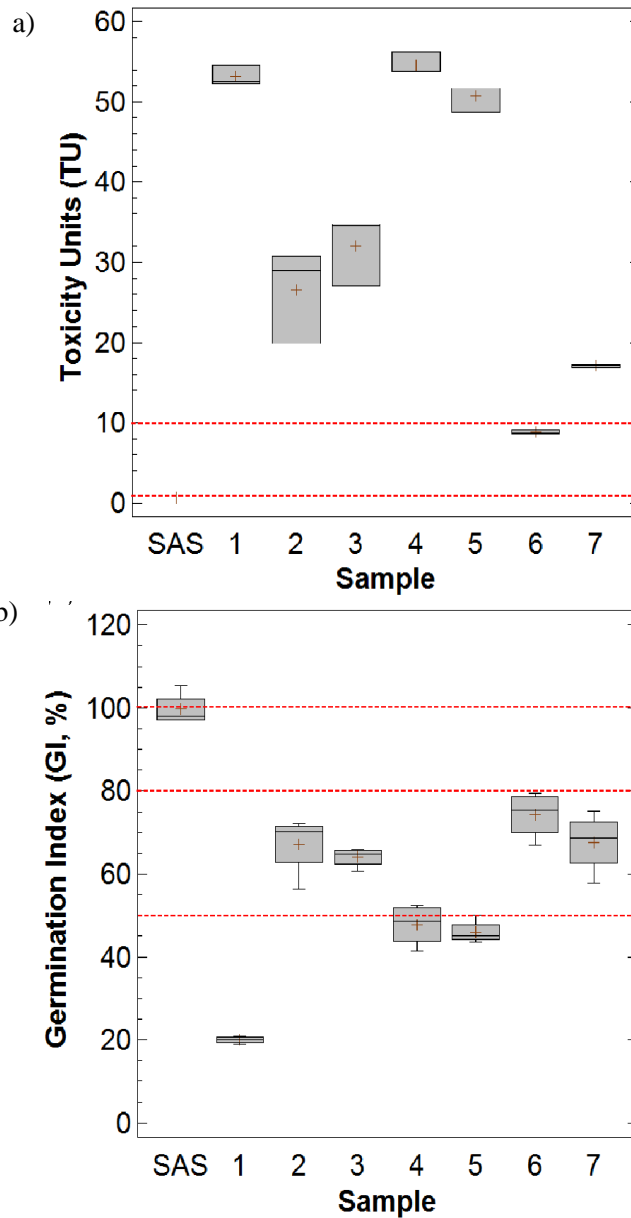


Figure 2. Boxplot showing a) ecotoxicity, represented as toxicity units (TU=100/EC50) and b) phytotoxicity, represented as Germination Index (GI %), of OMW sludge samples from evaporation ponds 1 to 7, and surrounding soil sample (SAS) taken as reference. Threshold values and classification are noted with dashed red lines and text on the right for ecotoxicity (Persoone et al., 2003) and phytotoxicity (Zucconi et al., 1985) classification. The values within the box (+) are the average of three replicates. The boxes bearing different letters were significantly different according to Fisher's LSD test ($p < 0.05$).

3.1.3. Microbial load, biodiversity, and metabolic activity

The culturable fungal and bacterial populations in most sludges were high, with levels for bacteria in the range of 10^5 - 10^8 CFU g^{-1} and those for fungi 10^3 - 10^7 CFU g^{-1} (Fig. S2, Supplementary material). Bacteria quantitatively and qualitatively dominated the microbial community over fungi (Table 2; Fig. S2, Supplementary material). These results contradict previous reports that found a predominance of fungi versus bacteria in OMW sludge stored in evaporation ponds or soil amended with OMW (Jarbouli et al., 2010; Sampredo et al., 2009). This effect has been attributed to the higher capability of fungi to adapt to recalcitrant compounds and low levels of water activity (Jarbouli et al., 2010) as well as to resist the antimicrobial effect of phenolic compounds (Amaral et al., 2012). These conditions would occur in OMW sediments during storage in evaporation pond. However, their effect on shaping the microbial community could be more complex than previously stated. In addition, it has to be considered that upon long-term exposure to stressful conditions, the microbial population adapts. In fact, it was clear that the microbial community was enriched in specialized representatives as evidenced by the high proportion of polyphenol-degrading (PO) bacteria and fungi in most ponds (Fig. S2, Supplementary material). In pond 6, whose OMW sludge had the highest amount of polyphenols recorded (Table 1), 100% of the culturable fungal population had polyphenol oxidizing activity. Fungi are characterized by the production of enzymes that provide them with degrading activity and tolerance to high concentrations of polyphenolic compounds (Jarbouli et al., 2010). But this capability is not restricted to fungi, many bacteria are capable of using polyphenol compounds (Pepi et al., 2010). Consequently, in an aged OMW sludge, the bacterial population could adapt just as well as the fungal population, even exceeding it in microbial load. This was noted also by the biodiversity differences (Table 2). As revealed by the metagenomic analysis, the total number of reads obtained from the seven OMW sludge samples was 149,106 for bacterial 16S rRNA and 205,594 for fungal ITS. These clustered into 905 and 811 OTUs, respectively (Table 2). Shannon biodiversity H' average values of 3 for bacteria and 1.5 for fungi, can be considered moderately high (Table 2). In general, materials from ponds 4, 5, and 6 had less rich and diverse bacterial communities than the other sludges. In the case of fungi, as predicted, the sample from pond 1 stood out for its extremely poor fungal community, having Shannon and Simpson indices close to zero, which is indicative of a low number

of species with a few representatives. In contrast, the sample from pond 5 had the highest fungal richness, biodiversity, and evenness values.

Table 2. Richness and diversity estimation of the 16S rRNA/ITS (bacterial/fungal) sequencing libraries from the MiSeq sequencing analysis in OMW sludges from evaporation ponds 1 to 7.

Sample (pond)	No of reads	Richness (OTUs Obs)	Chao_1	Shannon	Simpson (1-D)
Bacteria (16SrRNA)					
1	25,292	94	104	3.15	0.93
2	25,488	182	214	3.19	0.87
3	5,823	164	187	3.52	0.93
4	36,169	92	102	2.89	0.89
5	22,771	99	107	2.35	0.78
6	15,143	118	180	2.76	0.87
7	18,420	156	177	3.74	0.94
Fungi (ITS2)					
1	14,936	6	7	0.04	0.01
2	18,348	26	29	1.57	0.52
3	20,543	20	22	1.30	0.36
4	34,449	11	17	1.27	0.48
5	34,955	40	52	2.53	0.76
6	39,744	22	28	1.20	0.40
7	42,619	27	32	1.01	0.26

The cutoff value is 0.03 (sequence identity 0.97). OTUs and Chao are used to evaluate the community richness. Shannon and Simpson corrected are used to assess the community diversity and evenness. All results are based on a rarefied depth of 5,500 sequences for bacteria and 14,000 sequences for fungi. Average goods coverage was 99%.

The structure of the bacterial and fungal community according to genus diversity is shown in Figure 3. The bacterial community was dominated by the phylum *Proteobacteria* followed by *Actinobacteria* (Fig. S1, Supplementary material), as it has been also found in other OMW-related environments (Hernandez et al., 2018; Ntougias et al., 2013). However, there were slight differences at the phylum level between ponds that could be ascribed to physicochemical and nutrients availability differences. Thus, *Actinobacteria* was the dominant phylum in the mineral dry alkaline ponds 2 (58%) and 3 (45%); *Proteobacteria* in the ponds with higher moisture, organic load and neutral pH (Ponds 4 to 7 with levels higher than 53%), and *Firmicutes* in the sample from pond 1 (59%) having extreme conditions (Fig. S1, Supplementary material). Noteworthy, the most ubiquitous bacterial genus was *Halomonas*, a halotolerant member of the phylum *Proteobacteria*, which is mostly isolated from saline environments around the world (Vreeland, 2015), and reported in OMW environments (Ntougias et al., 2013). In line

with its tolerance to salts concentration, this bacteria accounted for more of 50% of the bacterial sequences in the ponds with higher EC (Ponds 4 to 6), and also in the sample from pond 1, the concentrated OMW sample; while its levels were low or null in ponds having lower EC (Ponds 2, 3, and 7). Another halotolerant bacteria found in most ponds was *Alkalibacterium*, a member of the phylum *Firmicutes*, which is an obligate alkaliphilic requiring pH above 8 to growth (Ntougias and Russell, 2015) and, as such, it was one of the main representatives in pond 1 and alkaline sludges from ponds 2 and 3. Other bacterial genera widely present in most ponds were *Paracoccus*, also found earlier in OMW (Ntougias et al., 2013), and *Nocardiopsis*, a member of the phylum *Actinobacteria* not reported earlier in OMW. In contrast to the common distribution of bacteria among different ponds, the fungal community was dominated in each pond by a particular genus as it was indicated by the low evenness values (Table 2).

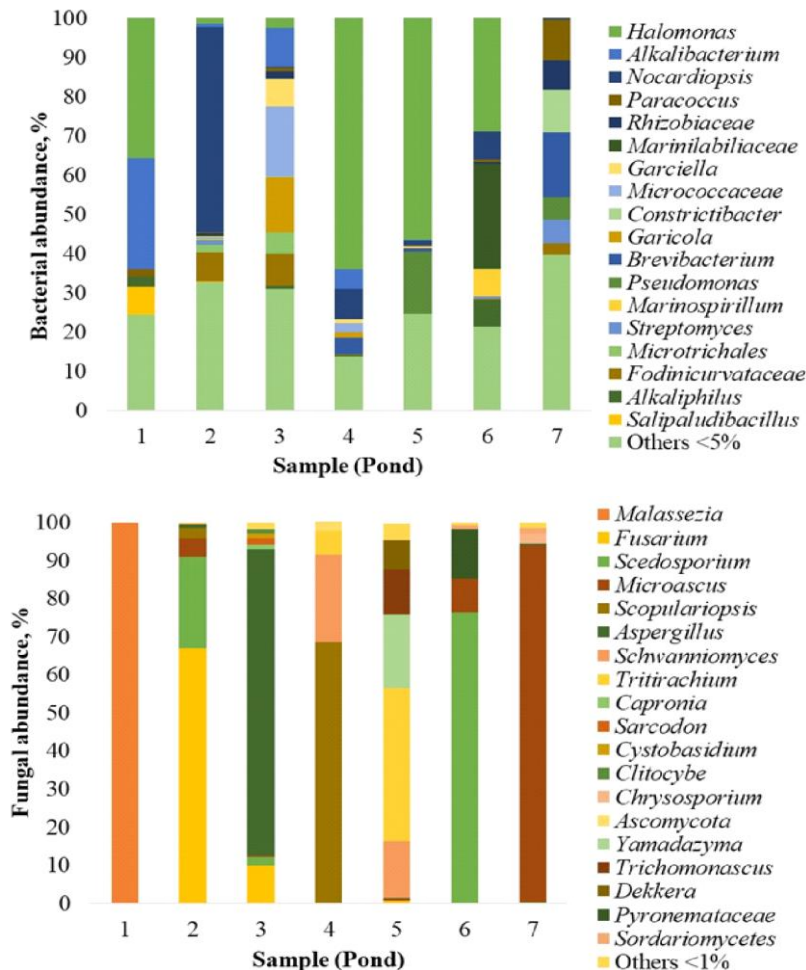


Figure 3. Bacterial and fungal genera diversity expressed as relative abundance (%) of OTUs in OMW sludge samples from evaporation ponds 1 to 7. For uncultured or ambiguous taxa sequences the lower known taxonomic rank is indicated as unclassified.

The fungal community included mainly members of the phylum Ascomycota (80%) while representatives of the phylum Basidiomycota accounted for the 20% (Fig. S1, Supplementary material). The dominant fungi for each pond were *Fusarium* (67%) in pond 2, *Aspergillus* (80%) in pond 3, *Scopulariopsis* (68%) in pond 4, *Tritirachium* (40%) in pond 5, *Scedosporium* (76%) in pond 6, and *Microascus* (93%) in pond 7. These fungal genera have been earlier described in OMW-related environments (Hernandez et al., 2018; Ntougias et al., 2013). Their success for one specific material in the ponds is a sign of the site-specific adaptation. The extreme case is the fungal community of sludge from pond 1, where a single fungal genus identified as *Malassezia* was found, which is described for the first time in OMW. This Basidiomycete is a yeast-like genus associated to the skin and mucous membranes of animals, sometimes generating some seborrheic dermatitis (Crespo-Erchiga and Florencio, 2006). To our knowledge, this is the first time this genus is described outside skin-related microbiota.

The functional analysis of microbial communities allows clarifying the interactions between the organisms and the environment. In this work, this analysis was performed using the Biolog Ecoplate technique that is a culture-dependent approach, which reveals the most active populations within the microbial community and thus, the community's physiological patterns (Feigl et al., 2017). The Biolog Ecoplates contain 31 substrates that can be potentially used as nutrients by microorganisms. The number of substrates metabolized and other functional biodiversity indices of the microbial community of the samples are shown in Table 3. The number of substrates oxidized by the OMW sludge community (functional richness) averaged 12 out of the 31 carbon sources, with a minimum of 1 in pond 1 and a maximum of 18 in pond 6. This was also the trend for the intensity of the metabolic activity, as shown by the values of AWCD (Average well color development), that reached the highest value (0.51) in pond 6 and the lowest in pond 1, where a negligible activity was found. The functional biodiversity expressed as Shannon index (H') was moderately high in all ponds, with a range of values between 2.0 (pond 1) and 2.8 (pond 6); while Shannon Evenness values indicate an unbalanced metabolic profile for the microbial community in pond 1 (low number of activities highly represented) and more balanced in the other samples. These results revealed that the availability of substrates contained in the organic matter and the toxic pressure were the main factors that influence the functional diversity of the microbial community of OMW sludges.

Table 3. Richness and diversity estimation of the physiological profile at the community level from the Biolog Ecoplate analysis of OMW sludge samples from evaporation ponds 1 to 7.

Sample (Pond)	R	AWCD	H'	E
1	1 a	0.01 a	2.06 a	0.00 a
2	14 c	0.37 e	2.64 de	0.99 b
3	12 b	0.34 cd	2.40 c	0.97 b
4	13 bc	0.36 de	2.48 cd	0.97 b
5	12 b	0.32 c	2.38 b	0.96 b
6	18 d	0.51 f	2.82 e	0.97 b
7	11 b	0.21 b	2.65 de	1.11 c
	**	**	***	***
LSD	2	0.03	0.23	0.06

* Values (n=3) within columns with different letters denote a statistically significant difference based on Fisher's LSD paired post hoc comparisons at 95% confidence level. LSD (Least Significant Difference) interval and significance of ANOVA test ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 are shown. R: number of substrates oxidized (substrate richness). AWCD: Average color development is an index of the total bioactivity; H': Shannon index (H) is the functional biodiversity index; E: Shannon evenness.

The relative abundance of the metabolic activities grouped according to the chemical family of the substrates is shown in Figure 4. The dominant functional activities were those related to the metabolism of polymers (31%) and carboxylic acids (24%), followed by carbohydrates and amino acids, both with average values of 14%, and amines and phenolic acids that were the less represented with relative average abundances of 9 and 7%, respectively. These results reflect that the majority of carbon sources in organic matter stored in the ponds might be recalcitrant polymers whose utilization could be mainly associated with the activity of fungal and Actinobacteria populations. These are known to be the main microbial groups involved in the utilization of polymers because of the production of extracellular enzymes (Kapur et al., 2018). The extreme case was the sample from the pond 1, in which 63% of the overall metabolic activity was related to polymer utilizing activity. This might be due to the scarcity of small sugars and organic acids that forces the utilization of alternative recalcitrant OMW-derived polymeric substrates. The activities related to the metabolism of carboxylic acids and carbohydrates, which are intermediates of organic matter degradation, were well represented in all OMW sludge samples. Those are likely used as the main carbon source for the abundant heterotrophic bacterial community. The fact that the utilization of carboxylic acids was the second largest metabolic activity after that of polymers, may be related to the higher

presence of these compounds in the sludges. These are mainly produced by bacteria and yeast during fermentative metabolism. This suggests an important anaerobic metabolic activity in the sludges during the storage. In addition, it is necessary to highlight the existence of a notable presence of activities related to the degradation of phenolic compounds. This was highly variable between the different ponds but somewhat related to the polyphenol content, e.g., sludge from pond 6 had the highest polyphenol content and also the higher metabolic activity for those compounds. Hentati et al. (2016) also found sharp differences in functional diversity between soils taken in the near an OMW evaporation pond with a clear dominium of carbohydrates and carboxylic acids metabolisms. Finally, it has to be emphasized that despite the toxic pressure recorded, all sludge samples, except that from pond 1, exhibited a wide range of metabolic activities that were also balanced. These represent a pool of potential activities that could be enhanced with the proper management of the environment e.g. supplying fresh organic matter that will have a biostimulant effect.

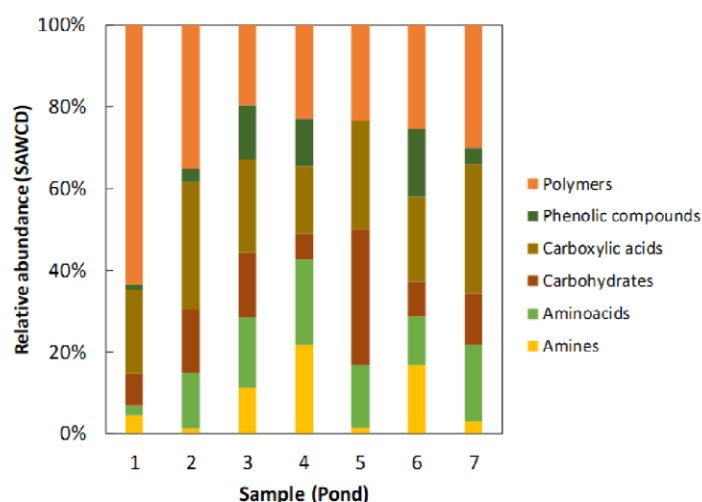


Figure 4. Relative abundance of metabolic activities according to substrate average well color development (SAWCD) of substrate categories present in Biolog EcoPlates® consumed by microbial communities in the different OMW sludges from ponds 1 to 7.

3.1.4. Relationship between parameters

The correlation matrix among physicochemical, toxicity, and microbiological parameters is shown in Fig. S3, Supplementary material. Moisture correlated negatively with pH ($r=-0.94$) and positively with organic matter ($r=0.93$), while pH correlated negatively with organic matter ($r=-0.92$). Noteworthy, electrical conductivity and

phenolic content showed a strong positive correlation ($r=0.98$). Moreover, as could be expected, GI and TU negatively correlated ($r=-0.97$), while this latter also correlated negatively with functional biodiversity index H' ($r=-0.84$). Total culturable bacteria and fungi correlated positively ($r=0.90$) while the latter was negatively correlated with H' ($r=-0.83$). Thus, fungal abundance influences negatively the metabolic diversity. For the PCA analysis, a parameter was selected in many cases between each pair that showed a strong linear correlation. The results of the PCA indicate that PC1 explained 49%, and PC2 27% of the total variance (Fig. 5).

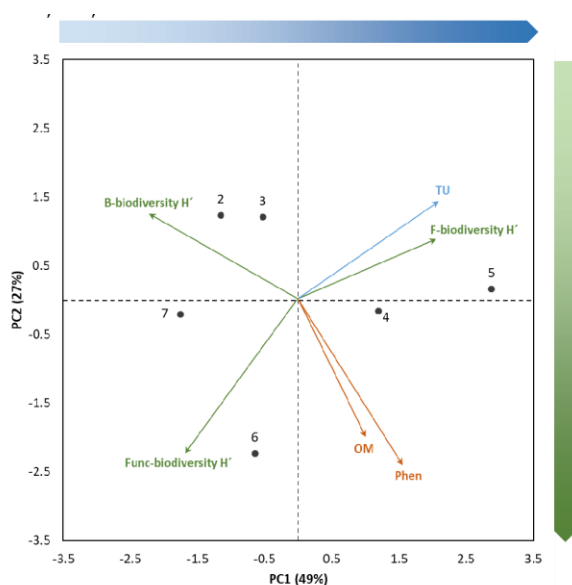


Figure 5. Biplot of the principal component analysis (PCA) for physicochemical, toxicity and microbiological parameters in the samples from ponds 2 to 7. The two principal components (PC1 and PC2) explained 76%. Arrows represent physicochemical (brown), toxicity (blue), and biological (green) parameters, and circles in grey represent OMW sludge pond sampling points. Variables considered: organic matter (OM), Phenolic compounds (Phen), toxicity units (TU), bacterial sequences Shannon biodiversity index (B-biodiversity H'), fungal sequences Shannon biodiversity index (B-biodiversity H'), and functional Shannon biodiversity index (Func-biodiversity H').

PC1 separated the OMW sludges according to their toxicity, which is related to organic matter and phenolic compounds content. The toxicity affects microbial communities by promoting the fungal biodiversity at expenses of bacterial biodiversity and lowering functional diversity. Accordingly, samples from ponds 4 and 5 grouped on the right side of the plot as the most toxic. In addition, PC2 separates OMW sludges based on the functionality of the microbial community being the content of OM and phenolic content the parameters that have also more weight load in determining that functionality.

Samples from ponds 4, 6, and 7 exhibited the highest levels in this axis. These results suggest that the organic matter and the polyphenol content besides the toxicity were the main drivers that determine the functional and taxonomical biodiversity of the microbial communities and partitioned the samples accordingly.

3.2. Impact of OMW sludge in soil depth

The spatial distribution of the toxicity (phyto- and ecotoxicity) and Cbio in the OMW sludge and soil layers of the pond 2 is shown in Figure 8. For comparison, the figure displays the three parameters measured that are represented in boxplots, including means for each layer, together with the spatial distribution of the parameter in OMW sludge (superficial) and soil (deep) layers according to kriging analysis predictions. The respirometry analysis on composite samples of each layer revealed that the respiration (DRI and AT4) was practically null in the OMW sludge layer. In the soil layer, average values of $0.15 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ OM h}^{-1}$ and $7.8 \text{ g O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ OM}$ for DRI and AT4 were obtained, respectively. The OMW sludge layer had higher microbial biomass carbon (Cbio) and toxicity than the soil layer (Fig. 6). In general, the toxic effect of OMW sludge did not have a high impact on the soil layer where low ecotoxic and null phytotoxic values were obtained. The spatial distribution of Cbio was quite variable in the OMW sludge layer, in which Cbio sharply ranged from 10 to 535 mg kg^{-1} exhibiting several hot pots mainly in the borders of the pond. In contrast, the values of Cbio were more homogeneous in the soil layer, ranging from 5 to 165 mg kg^{-1} . The ecotoxicity had an average of 22 TU in the OMW sludge layer, and 7 TU in the soil layer. In the OMW sludge layer, the ecotoxicity varied over a wide range (3 to 55 TU) and the spatial distribution was quite heterogeneous, with an area of the pond showing the highest values that coincide with the area where lower Cbio values were predicted. In the soil layer, most ecotoxicity values were below 10 UT except for two hot spots where it reached 45 TU and 20 TU, respectively. The Germination index (GI%) was higher in the soil layer (110%) than in the OMW sludge layer (72%) and ranged from minor points in the OMW sludge layer having values close to 29% (highly phytotoxic) to the most spread values close to the 72% average. In the soil layer, the values ranged from 66% to 125%, all not phytotoxic, with the lower values (more phytotoxic) obtained in the left upper corner of the pond, which coincides with the area with higher TU values for this layer.

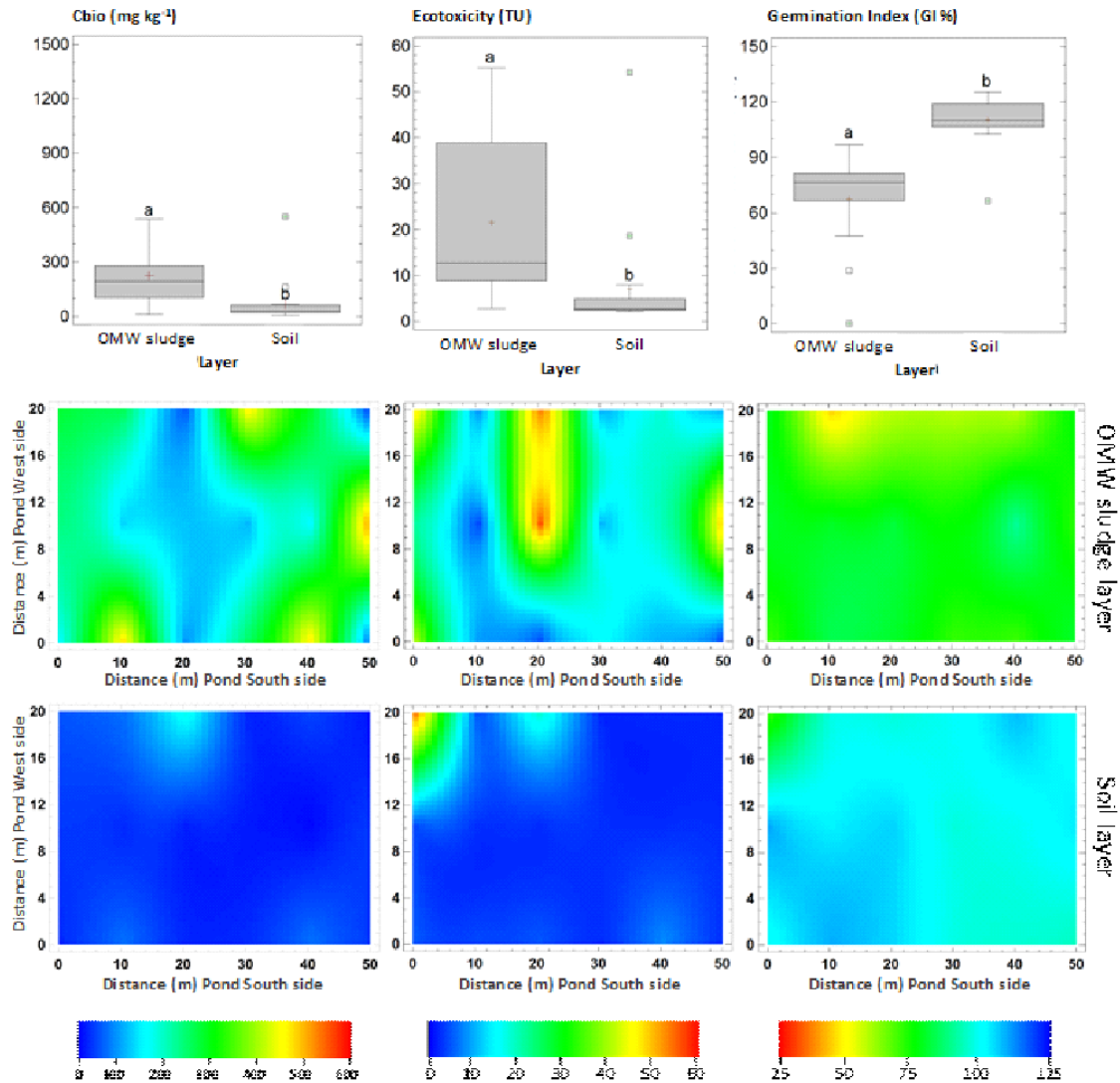


Figure 6. Comparison and spatial distribution of Microbial biomass Carbon (Cbio), ecotoxicity (TU) and phytotoxicity (GI%) in OMW sludge and soil layers of pond 2. Upper graphs show boxplots with average values within the box (+). The boxes bearing different letters were significantly different according to Fisher's LSD test ($p < 0.05$). Middle and bottom graphs show spatial distribution of the parameters in the two layers of the pond based on ordinary kriging method. The colour key at the bottom gives the value of the parameter represented in the maps. Graph and maps in each column refer to same parameter.

The overall results showed that the toxic effect was limited to the OMW sludge layer while it had a minor impact on the soil layer in the ponds analyzed. In addition, both layers contain a relatively abundant microbial biomass whose natural metabolic activity is restricted. The presence of many hot spots with high Cbio and toxicity values in the surface layer was matched with a dilution gradient in the soil layer. On the other side, the organic matter from OMW is responsible for increases of microbial load but the presence of the toxic compounds inhibits its activity. Therefore, the higher toxicity in the

superficial layer inhibits or slows down the metabolic activity of indigenous microorganisms and hence, inhibits respiration avoiding the favorable influence of their higher nutrient content. Previous studies on the effect of soil amendment with OMW or the impact of OMW evaporation ponds report a decrease in organic matter and phenolic compounds with depth (Kavvadias et al., 2017; Komnitsas et al., 2016) and a decline of phytotoxicity of soil as a consequence (Magdich et al., 2012). For these reasons, the native microbial population cannot naturally restore this environment. Although toxic components could reach deep layers by leaching, the impact is lowered by the microbial community that can easily biodegrade them due to the absence of toxic pressure.

4. Conclusions

The microbial community present in OMW sludges is abundant, rich, diverse, and has high metabolic potential but the toxic effects of OMW sludge components limit their natural bioremediation capabilities. These activities could be promoted by biostimulation strategies such as amendment with fresh organic matter. Although the OMW disposal in permeable evaporation ponds has significant impacts on the underlying soil, the contaminating effects are mainly limited to superficial OMW sludge layer. Taking advantage of the biological potential present in the sludges, an *in situ* bioremediation treatment, based on stimulating the growth of the indigenous microbiota, can be limited to the upper layer, without the need to carry out deep excavation operations. The knowledge provided by this study can be extrapolated to similar scenarios in OMW evaporation ponds widely spread throughout the Mediterranean basin and, in addition, contributes to the selection of sustainable and eco-friendly alternatives for the management of this sludge solving this environmental concern.

Acknowledgments

This work was supported by the project LIFE+REGROW [LIFE16 ENV/ES/000331] “Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons using bio-recovering strategies in a circular economy”. Authors are grateful to Mora municipality (Toledo, Spain) and to GESREMAN Company for their help during the field trials in OMW evaporation ponds.

5. References

Abid, N., Aloui, F., Dhouib, A., Sayadi, S., 2006. Olive mill wastewater sludge from evaporation ponds: evolution of physico-chemical parameters during storage and composting process. *Environ. Technol.* 27, 127-136.

Adani, F., Ubbiali, C., Generini, P., 2006. The determination of biological stability of composts using the dynamic respiration index: the results of experience after two years. *Waste Manage.* 26, 41-48.

Amaral, C., Lucas, M.S., Sampaio, A., Peres, J.A., Dias, A.A., Peixoto, F., Pais, C., 2012. Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 68, 45-50.

Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Babić, S., Malev, O., Pflieger, M., Lebedev, A.T., Mazur, D.M., Kužić, A., Trebše, P., 2019. Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays. *Sci. Total Environ.* 686, 903-914.

Beltrán, F.J., García-Araya, J.F., Álvarez, P.M., 1999. Wine distillery wastewater degradation. 1. Oxidative treatment using ozone and its effect on the wastewater biodegradability. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3911–3918.

Crespo-Erchiga, V., Florencio, V.D., 2006. *Malassezia* yeasts and pityriasis versicolor. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 139–147.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48(10), 1532-1552.

Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E., Molnár, M., 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Sci. Total Environ.* 595, 903-911.

Hentati, O., Oliveira, V., Sena, C., Bouji, M.S.M., Wali, A., Ksibi, M., 2016. Soil contamination with olive mill wastes negatively affects microbial communities, invertebrates and plants. *Ecotoxicology* 25, 1500-1513.

Hernández, D., Astudillo, C.A., Fernández-Palacios, E., Cataldo, F., Tenreiro, C., Gabriel, D., 2018. Evolution of physical-chemical parameters, microbial diversity and

VOC emissions of olive oil mill waste exposed to ambient conditions in open reservoirs. *Waste Manage.* 79, 501-509.

Jarboui, R., Chtourou, M., Azri, C., Gharsallah, N., Ammar, E., 2010. Time-dependent evolution of olive mill wastewater sludge organic and inorganic components and resident microbiota in multi-pond evaporation system. *Bioresour. Technol.* 101, 5749-5758.

Jarque, S., Masner, P., Klánová, J., Prokeš, R., Bláha, L., 2016. Bioluminescent *Vibrio fischeri* assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sludges. *Front. Microbiol.* 7, 1738.

Kapur, M.K., Das, P., Kumar, P., Kumar, M., Solanki, R., 2018. Role of Microbial Extracellular Enzymes in the Biodegradation of Wastes. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 6(3), 237-249.

Kavvadias, V., Elaiopoulos, K., Theocharopoulos, S., Soupios, P., 2017. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. *B. Environ. Contam. Tox.* 98, 323-330.

Komnitsas, K., Modis, K., Doula, M., Kavvadias, V., Sideri, D., Zaharaki, D., 2016. Geostatistical estimation of risk for soil and water in the vicinity of olive mill wastewater disposal sites. *Desalin. Water Treat.* 57, 2982-2995.

Magdich, S., Jarboui, R., Rouina, B.B., Boukhris, M., Ammar, E., 2012. A yearly spraying of olive mill wastewater on agricultural soil over six successive years: impact of different application rates on olive production, phenolic compounds, phytotoxicity and microbial counts. *Sci. Total Environ.* 430, 209-216.

Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J., 2020. Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through *in situ* composting assisted by bioaugmentation. *Sci. Total Environ.* 703, 135537.

Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2013. Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 2, 15.

Ntougias, S., Russell, N.J., 2015. *Alkalibacterium*, in: Whitman, W.B. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley and Sons, Ltd, Hoboken, NJ, pp. 1-5.

Ntougias, S., Bourtzis, K., Tsiamis, G., 2013. The microbiology of olive mill wastes. *BioMed Res.* 2013.

Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sanchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P., 1999. Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresour. Technol.* 67, 111-115.

Pepi, M., Lampariello, L.R., Altieri, R., Esposito, A., Perra, G., Renzi, M., Lobianco, A., Feola, A., Gasperini, S., Focardi, S.E., 2010. Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from olive mill waste mixtures. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 73-80.

Persooone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Kolar, B., 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environ. Toxicol.* 18, 395-402.

Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A., 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *J. Environ. Qual.* 39(2), 706-712.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590-D596.

Sala, M.M., Arrieta, J.M., Boras, J.A., Duarte, C.M., Vaqué, D., 2010. The impact of ice melting on bacterioplankton in the Arctic Ocean. *Polar Biol.* 33(12), 1683-1694.

Sampedro, I., Giubilei, M., Cajthaml, T., Federici, E., Federici, F., Petruccioli, M., D'Annibale, A., 2009. Short-term impact of dry olive mill residue addition to soil on the resident microbiota. *Bioresour. Technol.* 100, 6098-6106.

Sanchez-Hernandez, J.C., Sáez, J.A., Vico, A., Moreno, J., Moral, R., 2020. Evaluating Earthworms' Potential for Remediating Soils Contaminated with Olive Mill Waste Sediments. *Appl. Sci.* 10, 2624.

Souilem, S., El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., Sayadi, S., Galanakis, C.M., 2017. Olive oil production sector: environmental effects and sustainability challenges, in: Galanakis, C.M., (Eds.), *Olive mill waste: recent advances for sustainable management*, Academic Press, pp. 1-28.

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707.

Vreeland, R.H., 2015. *Halomonas*, in: Whitman, W.B. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley and Sons, Ltd, Hoboken, NJ, pp. 1-19.

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter, in: Gasser, J.K.R. (Eds.), *Composting of agricultural and other wastes*. Elsevier, London, UK, pp. 73-86.

Capítulo 2. Selección de inoculantes para la biorremediación de lodos de alpechín y validación de su eficacia

Graphical Abstract



Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through *in situ* composting assisted by bioaugmentation

Maria R Martínez-Gallardo, María J López, Macarena M Jurado, Francisca Suárez-Estrella, Juan A. López-González, José A Sáez, Raúl Moral, Joaquín Moreno

Publicado en: Science of the Total Environment (2020), 703, 135537. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135537.

Resumen: El método más habitual para la eliminación del alpechín, residuo líquido de la extracción de aceite de oliva, ha sido su acumulación en balsas de evaporación donde se concentran los sedimentos de dicho residuo. Debido al efecto fitotóxico y antimicrobiano del alpechín, los lixiviados de las balsas mal impermeabilizadas pueden contaminar los suelos y las aguas subterráneas. Este trabajo se centra en la búsqueda de microorganismos que puedan ser utilizados como inóculos para la biorremediación de suelos de balsas de alpechín, y la validación posterior de su eficacia mediante el compostaje *in situ*. Dos hongos aislados de los propios lodos de alpechín acumulados en las balsas, *Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16, presentaron las capacidades adecuadas para aplicarlos como un consorcio en estrategias de biorremediación. El compostaje eliminó la fitotoxicidad y ecotoxicidad de los sedimentos de alpechín al reducir sus principales componentes tóxicos. La inoculación con el consorcio fúngico mejoró la eficacia biorremediadora de la técnica al acelerar la disminución de la fitotoxicidad y la ecotoxicidad, y potenciar la propiedad fitoestimulante del compost producido. Este procedimiento constituye una estrategia prometedora para la biorremediación de ambientes contaminados con alpechín o con compuestos contaminantes similares.

Abstract

The common method for the disposal of olive oil mill wastewater (OMW) has been its accumulation in evaporation ponds where OMW sediments concentrate. Due to the phytotoxic and antimicrobial effect of OMW, leaks from ponds can pollute soils and water bodies. This work focuses on the search for microorganisms that can be used as inocula for bioremediation of polluted matrices in OMW ponds by means of *in situ* composting. Two fungi isolated from OMW sediments, *Aspergillus ochraceus* H2 and *Scedosporium apiospermum* H16, presented suitable capabilities for this use as a consortium. Composting eliminated the phyto- and ecotoxicity of OMW sediments by depleting their main toxic components. Inoculation with the fungal consortium improved the bioremediation efficacy of the technique by hastening the decrease of phytotoxicity and ecotoxicity and enhancing phytostimulant property of compost produced. This procedure constitutes a promising strategy for bioremediation of OMW polluted sites.

Keywords: Phytotoxicity; Ecotoxicity; Phenolic compounds; *In situ* composting; *Scedosporium apiospermum*; *Aspergillus ochraceus*.

Highlights

- The community of polyphenol degrading microorganisms dominates OMW sediments
- Novel fungal consortium from OMW evaporation ponds is used for its bioremediation
- In situ composting eliminated the ecotoxicity and phytotoxicity of OMW sediments
- The fungal consortium accelerated the bioremediation efficacy of in situ composting
- Compost from bioaugmented OMW sediments had an improved phytostimulant effect

1. Introduction

The olive-oil processing industry is one of the most successful foodstuffs industries around the Mediterranean basin. In the last decades, the production of olive oil in the Mediterranean countries reached about 2.5 million tons per year, accounting for 90% of world production (Galliou et al., 2018). This agroindustry also produces large amounts of liquid and solid residues coming from the olive milling and further decantation, which poses significant environmental concerns and, therefore, should be adequately managed.

The characteristics of the olive oil industry residues vary depending on the system used in the olive oil extraction, which has changed over the time. Between the 1970s and the 1990s, one of the most used olive oil extraction system was the three-phase decanter, which generates olive oil, solid olive pomace residue and liquid olive mill wastewater (OMW-3P). From the 1990s, a more efficient extraction process was developed consisting of a two-phase decanter that allowed minimizing the volume of spent water and produces olive oil and semisolid olive mill waste (OMW-2P). Although the three-phase method is not being used as much as before, the large accumulation of OMW derived from these systems remains a challenge today. In addition, it is estimated that nowadays 10-30 million m³ of OMW-3P are still generated each year (Souilem et al., 2017). The difficulty in handling and eliminating these wastes is linked to serious environmental issues, thus it is even now an unsolved problem (Zerva et al., 2017).

OMW-3P (OMW hereupon) is a liquid emulsion with a strong odor and dark brown to black color, which is composed of 50-94% water, 0.4-2.5% mineral salts, and 4-16% organic fraction (Hachicha et al., 2009). This fraction contains between 2-5% phenolic compounds, mainly phenols such as tyrosol and polyphenols such as secoiridoids and flavonoids (Dermeche et al., 2013). Although those compounds are lately known to have a wide number of applications upon extraction (Rahmanian et al., 2014), for example as antioxidants in the food industry (Galanakis et al., 2018), their uncontrolled disposal may cause serious environmental problems because of their high hydrophilicity, low biodegradability, and antimicrobial and phytotoxic effects (Senol et al., 2017).

The characteristics of OMW make difficult to apply a cost-effective treatment method (Galliou et al., 2018). The common practice for its management in Mediterranean

countries has been the storage in evaporation ponds. However, with this management strategy, these effluents are transformed into a more polluting and recalcitrant solid sediment in which toxic compounds are concentrated. In addition, construction of evaporation ponds rarely meets engineering criteria for safe accommodation of liquid wastes, therefore, OMW often overflows or leaks and pollutes neighboring agricultural and underneath soils and surface- and groundwater (Kavvadias et al., 2017). Therefore, there is an urgent need to provide methods for the restoration of areas affected.

Besides the potential use of liquid OMW for agronomic applications (Belaqziz et al., 2016), several physical, physicochemical and biological strategies have been proposed for their treatment (Dermeche et al., 2013). However, most of them are too expensive and unsuitable for the treatment of sediments and soil matrices polluted in evaporation ponds, because they usually require the material to be collected and transported for *ex situ* treatment. In addition, there is a lack of literature regarding the treatment and characteristics of the OMW sediments contained in evaporation ponds that are expected to be similar but not exactly the same as the original liquid OMW from which they derive. Here we propose *in situ* composting of OMW sediments as a means of not only bioremediate polluted materials in evaporation ponds but also recycling them into compost. In fact, composting is an efficient method for the biotransformation of recalcitrant compounds such as phenols and polyphenols (Souilem et al., 2017) and it has been successfully applied for OMW treatment when co-composted with other organic wastes producing high quality compost (Asses et al., 2018). For this reason, the *in situ* composting of OMW sediments in evaporation ponds can be a sustainable way to re-use these residues along with other organic wastes while simultaneously solving their negative environmental effects.

Composting usually performs well with indigenous microbial communities. However, the insufficient quantity or low activity of these communities because of the low biodegradability or high concentration of toxic compounds in materials such as OMW may lead to low efficiency and poor compost quality (Xu et al., 2018). In order to cope with this constraint and to improve abatement of recalcitrant or toxic components from OMW, it has been proposed to implement this strategy by bioaugmentation with specific microorganisms (Parotta et al., 2016). Several fungal species have proven to be effective for the aerobic treatment of OMW, being *Aspergillus* one of the most prominent genera related to the reduction of the polyphenolic compounds, chemical oxygen demand

and color of OMW (Salgado et al., 2016). Recently, this fungal genus along with *Mucor* and *Penicillium* have received considerable attention for their OMW bioremediation potential which is attributed to their enzymatic capabilities (Abd El-Aziz et al., 2015). Despite the progress in the biological treatment of OMW, the search for novel microbial strains able to eliminate the toxic effects of phenolic compounds is of significant scientific, environmental and industrial interest.

The aim of this work was to select microorganisms that could be used in bioaugmentation strategies to improve bioremediation of polluted sediments and soil matrices in OMW evaporation ponds by means of *in situ* composting. In order to carry out this study, the following goals were established: (1) to isolate, select and characterize microorganisms from OMW sediments that could be suitable for bioremediation of OMW polluted sites, and (2) to prove the efficacy of selected inoculum for the improvement of bioremediation capabilities of *in situ* composting of polluted material from OMW evaporation ponds.

2. Material and methods

2.1. Description of study area and sampling

The study was conducted in OMW evaporation ponds located in Mora municipality (Toledo, Spain) (39°40' 07.4" N 3°49' 40.2" W). The facility occupies 5 ha and includes eight evaporation ponds with dimensions between 2,400 m² and 12,000 m², whose use for OMW disposal started in 1982 and ended in 2007. Currently, they are no longer used, most ponds contain solid concentrated OMW sediments, and leachates are expected to affect the surrounding area because some ponds are not waterproofed. In this work, OMW sediments from seven ponds that were dry enough to hold mainly sediments were collected for analysis of microbiota (bacteria and fungi) and isolation of microorganisms that were further screened for inoculum selection for bioaugmentation experiments. In addition, one pond, containing the partially dried residue, having a total surface of 2,400 m² was used as the experimental site for bioremediation through *in situ* composting. In order to characterize initial status of the material contained in this pond, the site (80 m x 30 m) was divided in a grid of 18 sampling points, each separated 10 m, and samples were collected at surface (0-45 cm) and depth (45-90 cm). Phytotoxicity,

ecotoxicity and total water-soluble phenolic compounds were analyzed in these samples as explained in analytical.

2.2. Selection and characterization of inoculum for bioaugmentation

2.2.1. Counts of total and polyphenol-degrading microorganisms in ponds

Samples from seven ponds were used to estimate the ratio of microorganisms capable of biodegrade polyphenol compounds (microorganisms with polyphenol-oxidase activity) with respect to total microbial load. Five grams of each sample were suspended in 45 mL sterile saline solution (0.9% w/v NaCl) and shaken for 30 min at 120 rpm, after ten-fold serial dilutions, 100 μ L of appropriate dilutions were spread out on Plate Count Agar (PCA) (Panreac) for total bacteria colony counts and Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RB) (Panreac) for total fungi colony counts. For polyphenol-degrading microorganisms counts, dilutions were inoculated in PCA and Potato Dextrose Agar (PDA) (Panreac) added of tannic acid (Sigma) (0.5% w/v) for bacteria and fungi, respectively. In this case, colonies surrounded by brown halo were counted. After incubation at 30 °C for 48 h (bacteria) or 96 h (fungi), colonies were counted. The ratio of polyphenol-oxidase bacteria and fungi was expressed as a percentage of total bacteria and fungi counts, respectively.

2.2.2. Isolation and selection of OMW-degrading microorganisms

Microorganisms having polyphenol, phenol and lignin-related degrading capabilities were isolated from samples collected in OMW evaporation ponds. For this purpose, 100 μ L of ten-fold serial dilutions of samples prepared as above were spread on Petri dishes containing RBBR, PCA-TAN or PDA-TAN solid media. In the case of media containing tannic acid (PCA-TAN and PDA-TAN), the polyphenol-oxidase activity is detected, while in RBBR medium, it is the lignin degrading capability what is identified because the medium includes remazol brilliant blue R, an anthraquinone dye whose decolorization is related to the capability to degrade lignin (López et al., 2006). RBBR medium consists of (L^{-1}): 10 g glucose, 5 g peptone, 2 g yeast extract, 200 mg RBBR dye (Sigma), 20 g agar and 70 mL of trace element solution (Kirk et al., 1986). PCA-TAN and PDA-TAN contain the polyphenol tannic acid (0.5% w/v) and were prepared as

previously mentioned. After incubation at 30 °C for 48 h (bacteria) or 96 h (fungi), colonies showing brown color around growth area in PDA-TAN and PCA-TAN media and those decolorizing blue RBBR medium were selected and pure cultures were obtained from each (Figure 1). In addition, isolates were also obtained by enrichment of samples in liquid medium and further streaking on tyrosol-containing solid media (TYR). For enrichment cultures, 5 g of sample were placed in 250 mL Erlenmeyer flask containing 45 mL minimum mineral solution (MMS) (Janshekar et al., 1982) amended with (L^{-1}) 10 g glucose and 2 g yeast extract. Two enrichment cultures were prepared for each sample and incubated at 30 °C and 50 °C, respectively. After incubation at 120 rpm for 21 days, colonies were isolated by streaking on Petri dishes with TYR medium, which is composed of minimum mineral solution (MMS) added of (L^{-1}) 2 g yeast extract, 20 g agar and filter sterilized solution of tyrosol (Sigma) at a final concentration of 0.05% (w/v). After incubation at 30 °C or 50 °C for 48h, pure cultures of colonies growing in this medium were obtained. Isolates included fungi and bacteria, from whom filamentous actinobacteria were differentiated by their visible pseudomycelial growth and microscopic features. All isolates were preserved on slants at 4 °C and cryoballs (Cryoinstant Deltalab) at -80 °C.

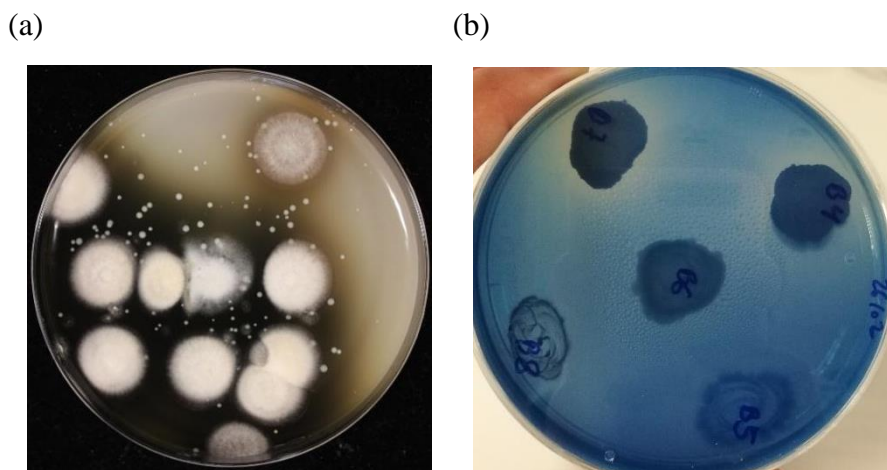


Figure 1. a) Colonies of microorganisms showing polyphenol-oxidase activity is indicated by dark-brown color in PDA-TAN media; b) Colonies of RBBR-degrading microorganisms show a transparent halo in RBBR medium.

Pure cultures of the isolated microorganisms were tested for RBBR decolorization, polyphenol oxidase activity, ligninolytic activity and for the detection of several enzymes related to lignin and phenols degradation (laccase, peroxidase,

tyrosinase, and extracellular oxidase) as described by López et al. (2006). Three replicates were used for each test.

The capability of isolates to use tyrosol, the main phenolic compound in OMW (Senol et al., 2017), as the sole carbon and energy source was quantified in liquid medium. For this, each isolate was inoculated in sterile 48 wells microplates (Thermo Scientific) containing 500 μ L liquid medium composed of minimum mineral solution (MMS) added of filter-sterilized solution of tyrosol (Sigma) at a final concentration of 0.05% (w/v). Inoculum consisted of 2-3 colonies of bacteria cultured on PCA for 24 h or 1 cm^3 agar plug from fungi cultured on PDA for 5 days. Non-inoculated wells were used as blank control. Three replicates were prepared per isolate and blank. Microplates were incubated for 7 days at 30 °C and tyrosol concentration was quantified afterwards using Folin-Ciocalteu reagent according to modified protocol of Sánchez-Rangel et al. (2013). Briefly, 255 μ L of each well were transferred to a 96 well microplate (Thermo Scientific) and added of 15 μ L Folin-Ciocalteu reagent (Sigma) and 30 μ L of 1N Na_2CO_3 . After 1 h in darkness, the absorbance was measured at 625 nm in a microplate reader spectrophotometer EON (Biotek). Tyrosol concentration was obtained by using tyrosol as standard (0-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The results were expressed as tyrosol degradation percentage by comparing the tyrosol concentration after incubation with those of blank controls.

2.2.3. Identification of isolates

Selected isolates were identified by molecular methods based on amplification and sequencing of 16S rRNA gen for bacteria using universal primers 27F (50-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-30) and 1492R (50-GGTTACCTTGTTACGACTT-30) and 5.8S-ITS ribosomal region for fungi using primers ITS1 (50-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-30) and ITS4 (50 TCCTCCGCTTATTGATATGC-30) according to methodology used in Jurado et al. (2014). The forward and reverse sequences were edited, assembled and aligned using the programs Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystem), Reverse Complement (www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), Clustal X v2.0.11, and MEGA 5 v5.2. The partial or nearly full-length sequences were compared for similar nucleotide sequences with the BLAST search of the National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.4. Characterization of inoculum for bioaugmentation

Two fungi were selected for their use as inocula for bioaugmentation and a series of additional tests were performed in order to ascertain their compatibility and thermal growth range tests. In the case that more than one isolate was selected, it would be necessary to determine if there was any inhibitory effect of one isolate against the other for later jointly incorporation for bioaugmentation as a consortium. To ascertain this, dual confrontations of the isolates were performed on PDA media by placing a 0.5 cm diameter plug of a five-days old culture of each fungus on PDA. After incubation for 4 days at 30 °C, the growth diameter of each microorganism was measured and the presence or absence of mycelium overlaps was visually determined. In addition, fungi were incubated at 25, 30, 40 and 50 °C and after incubation for 7-10 days, the growth was determined by measurement of mycelium diameter. Three replicates were used for each temperature and measurement.

2.2.5. Production of inoculum for bioaugmentation

The selected strains were produced in large quantities in order to be applied for bioaugmentation strategies in field experiments. Therefore, the two selected fungi were cultured separately in sterile glass Petri dishes of 20 cm diameter with 80-200 mL of Tryptone Soy broth (TSB) (Panreac) which were inoculated with 5 plugs of fungus cultured on PDA for 5 days. After incubation in static culture for 7-10 days at optimum temperature for each isolate, the mycelium biomass was collected. The biomass collected from each microorganism was vacuum packed in aliquots of about 67 g dry weight. Viability of the inoculum was determined by suspension of 1 g biomass of each microorganism in 900 µL of sterile saline solution (0.9% w/v NaCl). After ten-fold serial dilutions, 100 µL of appropriate dilution were spread out on PDA and counts were obtained after incubation at 30 °C for 5 days.

2.3. Composting experiments in pond

The bioremediation strategies based on *in situ* composting were carried out in one evaporation pond, where the OMW sediment from the first 45 cm layer of two 7.5 m x 7.5 m plots was extracted with an excavator truck. The sediment was thoroughly mixed with spent-mushroom compost (SM), rabbit manure (RM) and chicken manure (CM) at

the following w/w ratios 0.5:0.12:0.33:0.05 (OMW : SM : RM : CM), whose values were calculated according to their C and N content (Supplementary Table), in order to reach a final C/N ratio of 25. Additional information about the chemical characterization of initial OMW, organic amendments and the initial mix used is shown in Table 1. This mixture was incorporated in the two previously excavated plots to form two piles of 7.5 m long x 3.75 m wide x 1.5 m high. A pile was inoculated at the beginning of the process by spraying 40 L of a suspension containing a mixture of equal amounts of mycelial biomass from the two fungi in water (total amount 135 g dry weight) that supposed an inoculum load of 7×10^7 CFU per m^3 of material. Inoculation was performed layer by layer each at 50 cm height during pile building up, adding 8 L of fungal suspension to each layer. Throughout the composting period, water was incorporated by irrigation system to maintain humidity around 50-60%. During the bio-oxidative phase, the piles were turned over according to the thermal profile. Samples were collected at the beginning of the process and at about 60 day intervals up to the end of composting at 204 days. Analysis of phytotoxicity, ecotoxicity and total phenolic compounds were performed in each sample, while temperature, as indicator of composting process, was monitored throughout the whole process. Each sample was a composite of 200 g sub-samples collected from 5 different points of the entire pile.

Table 1. Initial mix composition*.

Material	Weight (t)	C (%)	N (%)	Moisture (%)	Apparent density (t/m^3)	Volume (m^3)
OMW	25	30	1,6	38,8	0,8	60,9
SM	12	46	0,6	74,8	0,35	34,3
CM	4	46	2,3	13,2	0,50	8,0
RM	32	48	1,2	62,8	0,40	79,5
IM	98	C/N=25		50	0,6	183

*SM: spent-mushroom compost; CM: chicken manure; RM: rabbit manure; IM: initial mix

2.4. Analytical techniques

Phytotoxicity was determined by the analysis of germination index in seeds of *Lepidium sativum*, according to slight modifications of method proposed by Zucconi et al. (1985). Briefly, the material was moistened until reaching 60% humidity, allowed to

stand for 30 minutes and further diluted with distilled water up to 10% (w/v). The aqueous extract was separated from solids by filtration through a cellulose membrane filter of 0.45 μm . Then, 4 mL of the aqueous extract was added in square dishes of 12 cm containing a filter paper on which 25 seeds of *L. sativum* were placed. Controls with distilled water were used as reference. Four replicates were used for each sample with a total of 100 seeds for determination. After incubation at 25 °C for 48 h in darkness, the number of seeds germinated was counted and the radical length was measured. Germination Index (GI) was calculated by multiplying the germinated seed number (G) by length of roots (L) and expressed as percentage (GI %) with respect to the control as follows: $GI = [(G_S\% \times L_S) / (G_{dw}\% \times L_{dw})] \times 100$; where: GI: Germination Index, $G_S\%$: percentage of germinated seeds in the presence of the sample, $G_{dw}\%$: percentage of germinated seed in the presence of distilled water, L_S : mean of radicle elongation (mm) in the presence of the sample, L_{dw} : mean of radicle elongation (mm) in the presence of distilled water.

Ecotoxicity was measured by determining the bioluminescence inhibition of *Aliivibrio fischeri* according to Jarque et al. (2016). Kinetic bioassays were performed in microplates using modified described by Bláha et al. (2010). Sample suspensions were prepared at concentration of 100 mg dry weight (dw) mL^{-1} in 2% NaCl, pH 7.0, mixed by vortex for 5 min and serial dilutions (1:2) of each sample were directly prepared into microplate. Final concentrations tested were 100, 50, 25, 12.5, and 6.75 mg dw mL^{-1} . The Aboatox kit (1243-500 BioTox kit) was used, following the protocol established for reconstitution and adequate dilution of *A. fischeri* (strain NRRL-B-11177). The luminescence measurements were made in Luminoskan Ascent Luminometer (Thermo Fisher Scientific). The inhibition of luminescence was calculated as follows: $INH\% = 100 - (IT_{15}/IT_0) \times 100$; where IT_{15} is the luminescence of the test sample after the contact time (15 min) (mV); and IT_0 is the initial luminescence (initial luminescence peak) of the sample (mV). For the calculation of the EC50 (concentration of the sample that causes a 50% reduction of the light emitted by the bacteria), the linear regression lines of concentration versus INH% were obtained. From this factor, the toxicity units (TUs) were calculated according to the formula $TU = [1/(EC_{50})] \times 100$ (Sprague and Ramsay, 1965).

Water-soluble phenols were quantified using Folin-Ciocalteu reagent according to protocol of Beltrán et al. (1999). Spectrophotometric readings at 765 nm were collected and absorbance was compared against a gallic acid as a standard.

2.5. Statistical analysis

Analytical were performed at least in triplicate and data are presented as the mean. A one-way analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests of Fisher's least significant difference (LSD) at a 95% confidence level were used to test for significant differences between factor levels. Normality and homogeneity of the variances were checked using the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively, before ANOVA. Analyses were carried out using Statgraphics Centurion XVII version 17.1.1 (Stat-Point, Inc.).

3. Results and discussion

3.1. Selection and characterization of inoculum consortia for bioaugmentation

One of the main objectives of this work was the isolation of microorganisms that could be used for bioaugmentation in bioremediation strategies of OMW contaminated sites such as abandoned evaporation ponds. The best source of samples for this purpose are OMW sediments from the ponds themselves. Thus, in order to determine the potential microbial resources available in OMW ponds for inoculum isolation, the proportion of polyphenol degrading bacteria and fungi with respect to total microbial load was analyzed in sediments collected from seven evaporation ponds. Results of these analyses are shown in Figure 2. The capability to degrade polyphenol is of special interest for OMW bioremediation because these compounds are the main responsible for the toxic effects of OMW (Dermeche et al., 2013). Thus, more than 40% of total bacteria and fungi were polyphenol degraders in most ponds and they dominated the bacterial and fungal population in ponds 3 and 6, reaching 84.5% and 100% of the total microbial group population, respectively. This high load of specialized microorganisms can be explained by adaptation phenomena because of the prolonged exposure. The indigenous microorganisms have successfully tolerated the presence of microbial inhibitory substances in OMW, such as polyphenol compounds, and would have developed metabolic abilities related to their degradation (Arous et al., 2018). Consequently, this preliminary study demonstrated the suitability of the samples for the inoculum isolation.

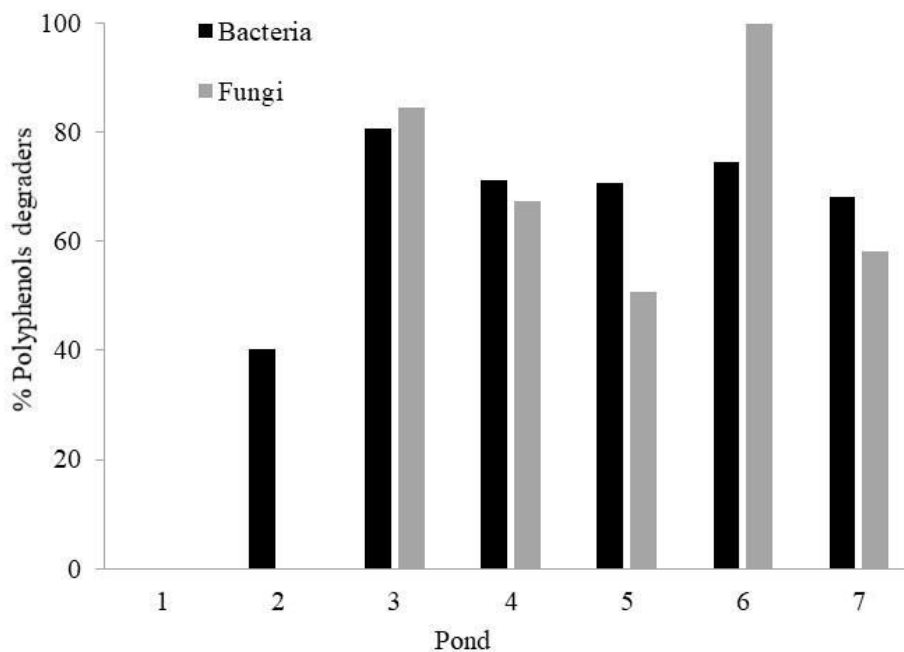


Figure 2. Proportion of polyphenol-degrading bacteria and fungi with respect to total microbial load in samples collected from evaporation OMW sediments ponds.

OMW are very complex in composition and the selection of microorganisms for the bioremediation of matrices contaminated with them requires the search of a quite high number of degradation activities in order to guarantee depletion of polluting compounds. Thus, the procedures for the screening and selection of microorganisms for the purpose of this work were designed to cover a wide range of degrading activities of compounds likely found in OMW, and also taking into account they were destined for bioaugmentation in composting. Polyphenols, as the main responsible of the toxic effects of OMW, were the primary target. These polymers are characterized by the presence of a wide variety of phenol structural units. Thus, culture media used for isolation included tannic acid as polyphenol model compound or tyrosol as polyphenol structural unit. In addition, capability to degrade lignin was also explored because of its connection with polyphenol activity. For this purpose, decolorization of anthraquinone dye RBBR was used to screen for ligninolytic potential (Palmieri et al., 2005) as well as the production of several ligninolytic and phenol-degrading enzymes (peroxidase, ligninase, laccase, oxidase, tyrosinase). In addition, incubations were performed at two different temperatures, 30 °C and 50 °C, in order to ensure the isolation of microorganisms that could resist thermal fluctuations during composting. One strategy for the isolation of

microorganisms involved the direct inoculation of selective media with samples of OMW sediments. In parallel, in order to favor the growth of microorganisms which were in low proportion or whose development was slow, other strategy consisted on enrichment of samples in liquid medium followed by isolation in selective media constituted by tyrosol, as a phenol model. Both procedures allowed obtaining a final collection of 60 strains, including 36 bacteria, 4 actinobacteria and 20 fungi.

A battery of qualitative and quantitative tests was used for all strains isolated in order to demonstrate the expression of enzymes and activities directly or indirectly involved in the degradation of the OMW compounds. The number of strains giving positive results for the tests performed are shown in Table 2. All the strains were able to grow in a medium with tyrosol. The peroxidase activity was detected in 43 strains. These enzymes help in the degradation of lignin and other aromatic compounds by using hydrogen peroxide as mediator. Thus, Zerva et al. (2017) demonstrated its production by two fungal species during OMW degradation showing high capacity of this enzyme for phenolic compounds oxidation. Polyphenol oxidase activity tested in media with tannic acid was detected in 22 strains. This enzyme is of interest due to its ability to hydroxylate phenolic compounds. The number of strains showing activities related to lignin degradation, such as RBBR dye decolorization and ligninase (LIG), laccase (LAC), oxidase (OXY) and tyrosinase (TYRase) production was quite low, only 6 to 8 strains exhibited some of these activities, though they are of great interest. Martínková et al. (2016) tested the potential ability of laccases and tyrosinases as degrading enzymes of the wide variety of phenolic compounds present in OMW. Laccase has also been studied by Sharma et al. (2018) who reported it as a powerful enzyme for the bioremediation of a wide range of pollutants such as phenolic compounds, aromatic heterocyclic compounds and amine containing aromatic compounds. Thereby, microorganisms capable of degrading lignin have metabolic capacities to degrade a wide range of aromatic compounds found in OMW (Zerva et al., 2017). In reference to the quantitative test based on the efficiency for tyrosol degradation, only 9 strains degraded between 80-100% of tyrosol, 6 of them depleted between 50-80% of tyrosol, while the rest of strains removed less than 50%. Fungi and actinobacteria were more active for tyrosol depletion than bacteria. While the best strains of fungi and actinobacteria eliminated more than 90% of such compound, bacteria barely reached 30%. In contrast, other researchers demonstrated a high phenol degradation ability for bacteria (Arous et al., 2018). These authors found a

bacterial consortium exhibiting a 64% phenolic compounds elimination efficiency. In addition, many aerobic bacteria seem to be very effective against some phenolic compounds and relatively ineffective against others, while fungi are more effective than bacteria in degrading both simple and complex phenolic compounds (Ayed et al., 2017).

Table 2. Number of isolates that showed positive results for the qualitative tests and degraded > 50% tyrosol.

Microorganism group	RBBR	PO	TYR	LAC	OXY	TYRase	PER	LIG	>50% TYR degradation
Actinobacteria	2	0	4	1	1	0	3	1	2
Bacteria	11	4	36	0	0	0	32	11	0
Fungus	13	18	20	6	5	8	8	2	13
Total	26	22	60	7	6	8	43	14	15

*RBBR: Remazol Brilliant Blue reactive decolorization; PO: Polyphenoloxidase; TYR: Growth in tyrosol-containing media; LAC: Laccase; OXI: Oxidase; TYRase: Tyrosinase; PER: Peroxidase; LIG: Ligninase; % TYR degradation: Percentage of tyrosol degradation.

The qualitative and quantitative analytical tests allowed the preselection of 8 strains, 6 fungi, 1 actinobacteria and 1 bacterium whose identification and metabolic capabilities are shown in Table 3. This selection was carried out based on the number of activities related to phenols degradation (three or more positive activities), microbial group and ability to degrade tyrosol. According to these criteria, the 8 strains showed a range of metabolic activities and physiological capacities that make them potentially suitable for the bioremediation of OMW polluted environments. Focusing on the selection of microorganisms for bioaugmentation in bioremediation of OMW by composting, the fungi H2 and H16 were selected taking into account the range of activities related to the metabolism of recalcitrant compounds as well as the capability to degrade tyrosol. H16 had five activities and degraded 97% tyrosol, while H2 expressed six relevant activities and degraded 77% tyrosol.

Table 3. Identification and metabolic capabilities of selected strains*.

Id	Species	bp	Accession number	S%	RBBR	PO	TYR	LAC	OXI	TYRase	PER	LIG	%TYR DEGR
A4	<i>Streptomyces koyangensis</i>	869	KM678242.1	99.8	0	0	1	0	0	0	1	0	96.6
B14	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	854	FJ174591.1	100	1	0	1	0	0	0	1	1	28.4
H1	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	623	KP987080.1	99.5	1	1	1	0	0	0	0	0	96.6
H2	<i>Aspergillus ochraceus</i>	581	KT803068.1	100	1	1	1	0	0	1	1	1	76.6
H10	<i>Pleurostora richardsiae</i>	380	MG966406.1	100	1	1	1	1	1	1	1	0	73.8
H16	<i>Scedosporium apiospermum</i>	593	KP132631.1	99.7	0	1	1	1	1	1	0	0	96.6
H18	<i>Aspergillus terreus</i>	596	MK541019.1	100	1	1	1	0	0	0	0	0	96.6
H21	<i>Cosmospora viridescens</i>	592	MF782760.1	99.8	0	0	1	0	0	0	1	0	96.6

*Id: A: Actinobacteria; B: Bacteria; H: Fungus; bp: base pairs; S%: Similarity percentage; RBBR: Remazol Brilliant Blue reactive decolorization; PO: Polyphenoloxidase; TYR: Growth in tyrosol-containing media; LAC: Laccase; OXI: Oxidase; TYRase: Tyrosinase; PER: Peroxidase; LIG: Ligninase; % TYR DEGR: Percentage of tyrosol degradation.

Therefore, fungi H2 and H16 were selected as prominent candidates to constitute an interesting set of microorganisms to use in bioaugmentation strategies because they cover a wide spectrum of metabolic capabilities. Other interesting strain was H10, that showed eight activities but it was not selected due to its slow growth and low sporulation. The fungi selected were identified as *Aspergillus ochraceus* H2 (Accession number NCBI KT803068.1) and *Scedosporium apiospermum* H16 (Accession number NCBI KP132631.1), with a similarity percentage of 100% and 99%, respectively.

S. apiospermum is a fungus belonging to the phylum *Ascomycota*, which has been isolated from various environments, such as effluents of wastewater treatment plants (Rougeron et al., 2018). The fact of finding this species commonly in contaminated soil and water led to extensive research on its use as bioremediation agents. Discoloration experiments conducted with strains of *Scedosporium* isolated from leachates and effluents from a wastewater treatment plant demonstrated that this fungus is a good candidate for bioremediation (Rougeron et al., 2018). This fungus has also been reported as a hydrocarbon degrading microorganism, it is able to degrade polluting compounds such as phenol, p-cresol, phenylbenzoate and its derivatives, toluene, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), long-chain aliphatic hydrocarbons, and mixtures of these contaminants (Clauben and Schmidt, 1998) and offers an opportunity to propose its use in controlled bioremediation or bioaugmentation processes. *Scedosporium* species are adequate for bioaugmentation since they are thermotolerant and have the ability to survive at extreme conditions. For this reason, Rougeron et al. (2018) proposed inoculation of plant residues during composting with *Scedosporium* cellulolytic species and demonstrated that it promoted the activation of the process.

The genus *Aspergillus* has also been extensively studied for use in bioremediation because of its versatility to biotransform or co-metabolize a variety of toxic compounds such as textile dyes, aromatic compounds, pesticides etc. (Sharma et al., 2018). The species *Aspergillus ochraceus* has been proposed for the treatment of OMW due to its capability to growth on phenols (Bevilacqua et al., 2017). *A. ochraceus* is also able to decolorize and degrade textile dye Reactive blue-25 mediated by the production of oxidative enzymes such as lignin peroxidase, laccase and tyrosinase (Parshetti et al., 2007). In the same way, Saratale et al. (2006) also reported that *A. ochraceus* could effectively decolorize several textile dyes such as malachite green and cotton blue.

In order to determine some practical aspects related to the combined application of *A. ochraceus* H2 and *S. apiospermum* H16 in field composting experiments, the thermal growth range of both microorganisms, their compatibility and potential synergistic degrading capabilities were tested. *A. ochraceus* H2 grew *in vitro* at 25 °C and 30 °C, with greater vigor at this last temperature, as it has also been reported by other authors (Palacios-Cabrera et al., 2005). *S. apiospermum* H16 grew *in vitro* between 25 °C and 40 °C at the maximum, as it was also reported by Clauben and Schmidt (1998). In general, no inhibitory effect of one fungus against the other was observed, as reflected by the overlapping of mycelium of both fungi at 25 °C (Figure 3). The two fungi were cultivated in liquid medium with tyrosol, separately and together, in order to determine the existence of synergistic effect in the degradation of this compound. This study revealed that the fungi H2 and H16 separately degraded 96% and 77% of tyrosol, respectively (Table 3), while together they completely eliminated the tyrosol (100%). According to these results, a mixed culture of both fungi can be grown and applied as a consortium since they are compatible and synergistically deplete toxic compounds. Moreover, the fact that both jointly covered a temperature growth range between mesophilic and thermotolerant conditions clearly benefit their persistence throughout thermal fluctuations during composting process. In fact, fungi are decisive for the proper development of composting, mainly because of their capability to produce a wide range of extracellular enzymes that breakdown polymers. They are present in all the different stages of the process (López-González et al., 2015). Mesophilic fungi persist in the outer layers of composting piles during the thermophilic stages and re-colonize when the temperature drops sufficiently (Gaur et al., 1982). Thus, after thermophilic stage, during the second part of the process, fungi can be found as the most significant decomposers (Sánchez et al., 2017). Although the consortium employed in this work was applied at the beginning of the composting, during the thermophilic stages they can persist in the out-layer or as spores and further colonize the whole material during turning operations allowing their propagation in the following stages. For this reason, whilst the optimum temperature for the growth of H2 and H16 are 30 and 40 °C respectively, it is expected that they will be present throughout the entire composting process.

Mycelial biomass of the two fungi was produced at large scale for bioaugmentation experiments whose results are described below. Before the vacuum packaging, the viability of the fungi was analyzed and counts were made. The inoculum

of *A. ochraceus* H2 had a load of 7.9×10^7 UFC g⁻¹ and in the case of *S. apiospermum* (H16) it was 1.1×10^8 UFC g⁻¹.



Figure 3. Confrontation of *A. ochraceus* H2 (left: yellow mycelium) and *S. apiospermum* H16 (right: white mycelium) after 10 days of culture at (a) 25 °C, (b) 30 °C, and (c) 40 °C.

3.2. OMW ponds bioremediation through composting: bioaugmentation with fungal consortium

In order to demonstrate the ability of the selected fungal consortium for improving bioremediation of OMW evaporation ponds by *in situ* composting, a field experiment was conducted in one pond in which two composting piles were built. Bioremediation capability was monitored by measuring phytotoxicity, ecotoxicity and total polyphenols. The analysis of the material contained in the pond revealed that contamination was limited to the upper 45 cm layer. Phytotoxicity and ecotoxicity were higher in the upper layer (0-45 cm) than in depth (45-90 cm), in fact, both effects were absent in the deeper layer. The upper layer had 66% GI and the deeper layer 107% GI. The results concerning ecotoxicity were 1.2 TU and 2.6 TU in deeper and upper layer, respectively. The total water-soluble polyphenolic compounds were very high, with an average value of $3.4 \text{ g kg}^{-1} \text{ dw}$. These components were more abundant in the superficial layer, where a concentration of $4.7 \text{ g kg}^{-1} \text{ dw}$ was obtained, than in the deep one ($2.2 \text{ g kg}^{-1} \text{ dw}$). This indicated the existence of an interrupted vertical flow, as well as capillarity and evaporative phenomena, which allow a higher concentration in superficial layer. Consequently, for *in situ* composting only the first 45 cm layer of sediment was recovered, mixed with organic waste amendments (spent-mushroom compost, rabbit manure and chicken manure) and placed in the two sub-plots in the pond to build up two piles, one was inoculated with fungal consortium and the other was not inoculated.

During composting, the thermal profile of the two piles (inoculated and non-inoculated) was similar. Material reached thermophilic phase ($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) 3 days after piles were built and temperature increased up to $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ at day 18. Five turnings were applied at about biweekly intervals, according to thermal register, each performed once temperature showed a decreasing trend for more than three consecutive days. The bio-oxidative phase, with increases of temperature to values higher than $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ after each turning, lasted for 115 days. During the first 90 days, temperature values higher than $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ were maintained for more than 7 days. After 115 days, material cooled down and did not warm even after turning, so maturation phase started and ambient temperatures were maintained up to the end of composting on day 204. Samples were collected for analysis at the beginning (0 days), at the middle of bio-oxidative phase (84 days), at maturation phase (154 days) and at the end of experiment (204 days).

The phytotoxicity evolution, expressed as germination index (GI), is shown in Figure 4a. Values of GI below 50% indicate high phytotoxicity, GI above 80% indicate absence of phytotoxicity, while values above 100% indicate phytostimulant effect (Zucconi et al., 1985; Emino and Warman, 2004). The mixture used for composting was more phytotoxic (GI 49%), than untreated OMW sediments in the pond (GI 66%), considered as initial reference value. This is due to the addition of fresh organic matter (spent mushroom, chicken and rabbit manure) to the OMW sediments that causes lack of oxygen as result of intense microbial activity leading to phytotoxicity (Hachicha et al., 2009). GI values increased gradually during composting in the two piles, surpassing 100% at bio-oxidative phase (84 days) in the non-inoculated pile and at maturation phase (154 days) in the inoculated pile. This means that the materials were phytostimulants. Thus, the composting process stabilized organic matter and depleted phytotoxic compounds; as a result, compost derived from OMW is suitable for use as organic amendment. Although the absence of phytotoxicity was reached before in non-inoculated pile, the GI of final compost after 204 days was significantly higher in the inoculated pile (113%) than in the non-inoculated (105%). These results showed that the inoculum had a positive effect by providing a final compost of higher quality with respect to its phytostimulant character. Similarly, Parotta et al. (2016) found that the treatment of composting piles with inoculants belonging to the genus *Serratia* and *Pantoea/Enterobacter* isolated from OMW led to an increase in the GI.

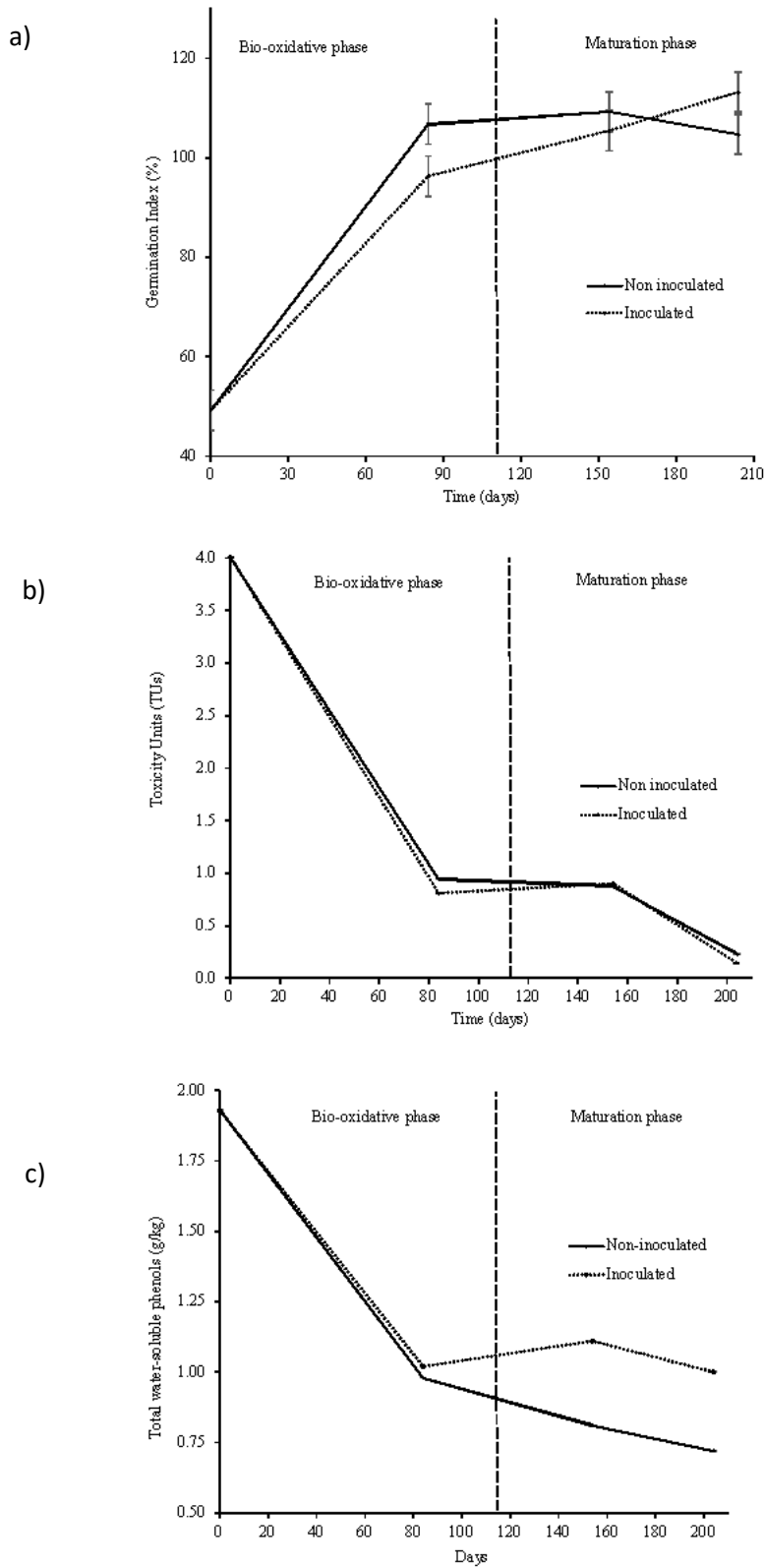


Figure 4. Evolution of phytotoxicity (a), ecotoxicity (b) and total phenols (c) in OMW composting piles non-inoculated and inoculated with fungal consortium. Main phases of composting are indicated. Results are the mean of three replicates. Errors bars represent the LSD Fisher interval (p<0.05).

The results obtained in the evaluation of the ecotoxicity during composting are shown in Figure 4b. The ecotoxicity values were expressed as toxicity units (TU). According to Persoone et al. (2003), the ecotoxicity can be classified into one of the following categories: $TU > 100$, very high acute toxicity; $10 < TU < 100$, high acute toxicity; $1 < TU < 10$, acute toxicity; $0.4 < TU < 1$, slight acute toxicity; and $TU < 0.4$, no acute toxicity. As previously described, OMW is a residue rich in polyphenols that causes high ecotoxicity and has a strong antibacterial effect. Thereby, untreated OMW sediment had acute toxicity (2.6 TU) and similar to what was found for phytotoxicity, an increase in ecotoxicity was obtained when organic matter was added to the untreated material (4 TU). These levels progressively decreased since the beginning of composting. Both materials, inoculated and non-inoculated, reached $TU < 1$ at 84 days, being significantly lower in inoculated (0.8 TU) than in non-inoculated (0.9 UT) pile. Considering the toxicity classification mentioned above, the material had slight acute toxicity after 84 days composting. Between the bio-oxidative phase (84 days) and the middle of maturation phase (105 days), ecotoxicity did not change significantly but decreased afterwards reaching final values $TU < 1$ which were lower in inoculated pile (0.14 TU) than in non-inoculated pile (0.23 TU). Thus, the final compost obtained from both treatments were non-ecotoxic.

The decrease of phytotoxicity (increase in GI) and ecotoxicity of OMW sediments during composting above discussed may be partially explained by the decrease in water-soluble phenolic compounds, whose results are shown in Figure 4c. These compounds are known to be the main responsible of OMW toxicity (Duarte et al., 2011). The untreated OMW material had 22.89 g kg⁻¹ dw of water-soluble phenolic compounds and when it was mixed with organic waste amendments the content decreased to 1.93 g kg⁻¹ dw, likely because of dilution. During composting, in the non-inoculated compost pile, these compounds steadily decreased reaching a concentration of 0.72 g kg⁻¹ dw in the final product. The inoculated compost pile performed similarly during bio-oxidative phase, in which a 50% phenolic compounds were depleted and their concentration at day 84 (1.02 g kg⁻¹ dw) was close to that in non-inoculated pile. However, no further decreases in phenolic compounds were obtained for inoculated pile during maturation. In fact, they slightly increased up to 1.11 g kg⁻¹ dw at maturation phase (154 days). This phenomenon has also been reported by Jurado et al. (2015) during composting of bioaugmented lignocellulosic waste. This can be due to the release of phenols from the

lignocellulose matrix of organic waste amendments as consequence of a more intense microbial degradation of lignin fraction in inoculated pile, rather than phenols from OMW themselves. However, despite the higher phenolic content in final material of inoculated pile with respect to non-inoculated one, they did not lead to higher toxic effects, as previously discussed. This relates to the fact that toxic effect of phenolic compounds involves a complex interplay between different phenolic substances from OMW in dependence on their concentrations, mixture composition and toxicity mechanisms (Buchmann et al., 2015).

Table 4 summarizes the bioremediation effect of *in situ* inoculated and non-inoculated composting of OMW sediments in evaporation ponds. As stated above, composting eliminated the toxicity of OMW sediments by depleting almost completely (>95%) their main toxic components and leading additionally to a phytostimulant and ecotoxicity-free compost product. Furthermore, the fungal consortium used for bioaugmentation in inoculated composting had the ability to enhance the bioremediation, as noticed by the higher phytostimulant and lower ecotoxic values in final compost in comparison to those coming from non-inoculated composting. This compost could be used for agronomic applications as it has been also proposed elsewhere for compost obtained from olive mill wastes (Asses et al., 2018).

Table 4. Bioremediation effect of *in situ* inoculated and non-inoculated composting of OMW sediments in evaporation ponds. Values are the mean of three replicates. Values with same letter in a column are not significantly different (LSD, $p < 0.05$)*.

Treatment	Phytotoxicity (GI%)	Ecotoxicity (TU)	WSP (g/kg dw)
Untreated OMW sediments	65.97 a	2.57 a	22.89 a
<i>In situ</i> non inoculated composting	104.71 b	0.23 b	0.72 b
<i>In situ</i> inoculated composting	113.17 c	0.14 c	1.00 c

*WSP: Water Soluble Phenolics

4. Conclusions

OMW sediments from evaporation ponds are naturally enriched in polyphenol-degrading microorganisms. The fungi isolated from these materials, *Aspergillus*

ochraceus H2 and *Scedosporium apiospermum* H16, presented a range of metabolic and physiological capabilities suitable for their use as consortium in bioremediation. The *in situ* composting of OMW sediments in evaporation ponds is a sustainable way to recycle them along with organic waste, while simultaneously solving their negative environmental impact. The use of fungal consortium for bioaugmentation of composting improves the bioremediation efficacy of the technique by speeding up the decrease of phytotoxicity and ecotoxicity and enhancing phytostimulant property of compost produced.

Acknowledgments

This research was financially supported by the project LIFE+REGROW (LIFE16 ENV/ES/000331) “Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons using bio-recovering strategies in a circular economy”. Authors are grateful to Mora municipality (Toledo, Spain) and to GESREMAN Company for their help during the field trials in OMW evaporation ponds.

5. References

Abd EL-Aziz, A.B.E.-D., Awad, A.A.E.-N., Zaki, G.H., 2015. Reduction of olive oil mill waste water phenolic compounds and COD using *Paecilomyces variotii*. Trends in Industrial Biotechnology Research 1, 1-9.

Arous, F., Hamdi, C., Kmiha, S., Khammassi, N., Ayari, A., Neifar, M., Jaouani, A., 2018. Treatment of olive mill wastewater through employing sequencing batch reactor: performance and microbial diversity assessment. 3 Biotech 8(11), 481.

Asses, N., Farhat, A., Cherif, S., Hamdi, M., Bouallagui, H., 2018. Comparative study of sewage sludge co-composting with olive mill wastes or green residues: process monitoring and agriculture value of the resulting composts. Process Safety and Environmental Protection 114, 25-35.

Ayed, L., Asses, N., Chammem, N., Othman, N.B., Hamdi, M., 2017. Advanced oxidation process and biological treatments for table olive processing wastewaters: constraints and a novel approach to integrated recycling process: a review. Biodegradation 28(2-3), 125-138.

Beltrán, F.J., García-Araya, J.F., Álvarez, P.M., 1999. Wine distillery wastewater degradation. 1. Oxidative treatment using ozone and its effect on the wastewater biodegradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(9), 3911-3918.

Bevilacqua, A., Cibelli, F., Raimondo, M.L., Carlucci, A., Lops, F., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2017. Fungal bioremediation of olive mill wastewater: using a multi-step approach to model inhibition or stimulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(2), 461-468.

Bláha, L., Hilscherová, K., Čáp, T., Klánová, J., Machát, J., Zeman, J., Holoubek, I., 2010. Kinetic bacterial bioluminescence assay for contact sediment toxicity testing: relationships with the matrix composition and contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(3), 507-514.

Buchmann, C., Felten, A., Peikert, B., Muñoz, K., Bandow, N., Dag, A., Schaumann, G.E., 2015. Development of phytotoxicity and composition of a soil treated with olive mill wastewater (OMW): an incubation study. *Plant and Soil* 386(1-2), 99-112.

Clauben, M., Schmidt, S., 1998. Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Research in Microbiology* 149(6), 399-406.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48(10), 1532-1552.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Asatiani, M.D., 2018. Efficient production of lignin-modifying enzymes and phenolics removal in submerged fermentation of olive mill by-products by white-rot basidiomycetes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 134, 39-47.

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

Galliou, F., Markakis, N., Fountoulakis, M.S., Nikolaidis, N., Manios, T., 2018. Production of organic fertilizer from olive mill wastewater by combining solar greenhouse drying and composting. *Waste Management* 75, 305-311.

Gaur, A.C., Sadasivam, K.V., Mathur, R.S., Magu, S.P., 1982. Role of mesophilic fungi in composting. *Agricultural Wastes* 4(6), 453-460.

Hachicha, S., Cegarra, J., Sellami, F., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., Ammar, E., 2009. Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark. *Journal of Hazardous Materials* 161(2-3), 1131-1139.

Janshekar, H., Haltmeier, T., Brown, C., 1982. Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 14(3), 174-181.

Jarque, S., Masner, P., Klánová, J., Prokeš, R., Bláha, L., 2016. Bioluminescent *Vibrio fischeri* assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sediments. *Frontiers in Microbiology* 7, 1738.

Jurado, M., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Moreno, J., 2014. Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology* 162, 283-293.

Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Moreno, J., 2015. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 186, 15-24.

Kavvadias, V., Elaiopoulos, K., Theocharopoulos, S., Soupios, P., 2017. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98(3), 323-330.

Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E., Farrell, R.L., 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology* 8(1), 27-32.

López, M.J., Guisado, G., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Moreno, J., 2006. Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme and Microbial Technology* 40(1), 42-45.

Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., Homolka, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by *Basidiomycota* and its phenol oxidases: a review. *Chemosphere* 149, 373-382.

Palmieri, G., Cennamo, G., Sanna, G., 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 36(1), 17-24.

Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M.H., Hashimoto, J.M., Menezes, H.C.D., 2005. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology* 36(1), 24-28.

Parotta, L., Campani, T., Casini, S., Romi, M., Cai, G., 2016. Impact of raw and bioaugmented olive-mill wastewater and olive-mill solid waste on the content of photosynthetic molecules in tobacco plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(30), 5971-5984.

Parshetti, G.K., Kalme, S.D., Gomare, S.S., Govindwar, S.P., 2007. Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Bioresource Technology* 98(18), 3638-3642.

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Kolar, B., 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology* 18(6), 395-402.

Rougeron, A., Giraud, S., Alastruey-Izquierdo, A., Cano-Lira, J., Rainer, J., Mouhajir, A., Bouchara, J.P., 2018. Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research. *Mycopathologia* 183(1), 185-200.

Salgado, J.M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., Domínguez, J.M., Belo, I., 2016. Combined bioremediation and enzyme production by *Aspergillus* sp. in olive mill and winery wastewaters. *International Biodeterioration and Biodegradation* 110, 16-23.

Sánchez, Ó.J., Ospina, D.A., Montoya, S., 2017. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste management* 69, 136-153.

Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D.A., 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* 5(21), 5990-5999.

Senol, A., Hasdemir, İ. M., Hasdemir, B., Kurdaş, İ., 2017. Adsorptive removal of biophenols from olive mill wastewaters (OMW) by activated carbon: mass transfer, equilibrium and kinetic studies. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 12(1), 128-146.

Saratale, G.D., Kalme, S.D., Govindwar, S.P., 2006. Decolorisation of textile dyes by *Aspergillus ochraceus* (NCIM-1146). *Indian Journal of Biotechnology* 5, 407-410.

Sharma, B., Dangi, A.K., Shukla, P., 2018. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of Environmental Management* 210, 10-22.

Souilem, S., El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., Sayadi, S., Galanakis, C.M., 2017. Olive oil production sector: environmental effects and sustainability challenges. In:

Galanakis, C.M., (Eds.), Olive mill waste: recent advances for sustainable management, Academic Press, pp. 1-28.

Sprague, J.B., Ramsay, B.A., 1965. Lethal levels of mixed copper–zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 22(2), 425-432.

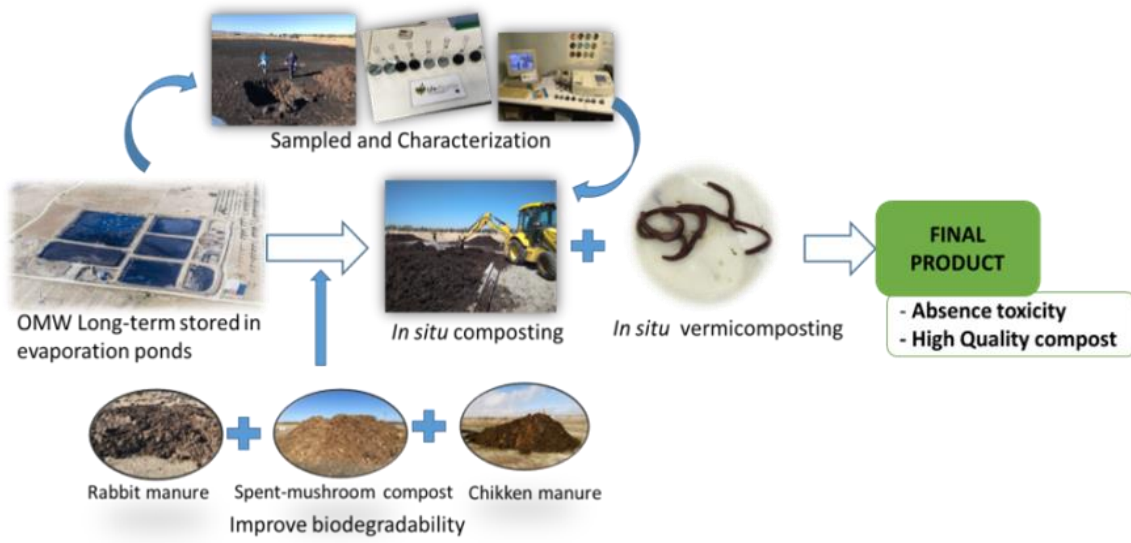
Xu, J., Lu, Y., Shan, G., He, X.S., Huang, J., Li, Q., 2018. Inoculation with compost-born thermophilic complex microbial consortium induced organic matters degradation while reduced nitrogen loss during co-composting of dairy manure and sugarcane leaves. *Waste and Biomass Valorization* 9, 1-11.

Zerva, A., Zervakis, G.I., Christakopoulos, P., Topakas, E., 2017. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 203, 791-798.

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser J.K.R., (Eds.), *Composting of agricultural and other wastes*, Elsevier, London, UK, pp. 73-86.

Capítulo 3. Estudio en profundidad de compostaje y vermicompostaje

Graphical Abstract



Olive mill wastewater-evaporation ponds long term stored: integrated assessment of in situ bioremediation strategies based on composting and vermicomposting

Sáez, J.A., Pérez-Murcia, M.D., Vico, A., Martínez-Gallardo, M.R., Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., Bustamante, M.A., Sanchez-Hernandez, J.C., Moreno, J., Moral, R.

Publicado en: Journal of Hazardous Materials (2021), 402, 123481. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123481.

Resumen: El método más utilizado para gestionar las aguas residuales de almazara (alpechín) derivadas de la producción de aceite de oliva ha sido, durante las dos últimas décadas, su eliminación en balsas de evaporación. El almacenamiento a largo plazo del alpechín conduce a la acumulación de sedimentos tóxicos, ricos en compuestos recalcitrantes con propiedades fitotóxicas y antimicrobianas, que limitan su uso con fines agronómicos. El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de dos estrategias de biorremediación *in situ* (compostaje y una combinación de compostaje seguida de vermicompostaje) para eliminar la potencial toxicidad de los sedimentos derivados del alpechín almacenado a largo plazo. Los resultados obtenidos mostraron que el método de compostaje seguido de vermicompostaje fue más eficaz que sólo el compostaje en la eliminación de los compuestos fenólicos y la ecotoxicidad presente en los sedimentos de alpechín, especialmente durante la etapa de maduración. Además, el vermicompostaje redujo potencialmente la salinidad de los sedimentos de alpechín. Sin embargo, es necesario un proceso de pre-compostaje antes del vermicompostaje para proporcionar las condiciones adecuadas para la supervivencia y la actividad de las lombrices. Adicionalmente, el compost final mostró un efecto fitoestimulante. Por lo tanto, estas estrategias de biorremediación *in situ* pueden considerarse herramientas potenciales para la descontaminación y recuperación de sedimentos de alpechín almacenadas a largo plazo en balsas de evaporación, lo que actualmente supone una preocupación medioambiental sin resolver.

Abstract

During the last two decades, the method most widely used to manage olive mill wastewater (OMW) derived from olive oil production has been its disposal in evaporation ponds. Long-term storage of OMW leads to the accumulation of toxic sediments (OMWS) rich in recalcitrant compounds with phytotoxic and antimicrobial properties, which limit their use for agronomic purpose. The aim of this study was to compare the effect of two *in situ* bioremediation strategies (composting and a combination of composting followed by vermicomposting) to remove the potential toxicity of the sediments derived from long-term stored OMW. The results obtained showed that the composting method assisted with the earthworms enhanced the depletion of phenolic compounds and OMWS ecotoxicity more than composting, especially during the maturation stage. Moreover, vermicomposting was more effective in the reduction of the OMWS salinity. However, a pre-composting process to the OMWS is necessary prior to vermicomposting to provide the suitable conditions for earthworms survival and activity. Furthermore, the final compost showed a phytostimulating effect. Therefore, these *in situ* bioremediation strategies can be considered potential tools for decontamination and recovery of long-term stored OMWS in evaporation ponds, which currently poses an unsolved environmental problem.

Keywords: compost, vermicompost, olive oil waste, phenolic compounds, phytotoxicity

1. Introduction

In the olive oil industry, the disposal of olive oil mill wastewater (OMW) constitutes an environmental concern in the Mediterranean countries (Gaillou et al., 2018), which produce 97% of total olive oil worldwide. This implies that the waste derived from this agro-industry is highly concentrated in some regions solely dedicated to the cultivation of olive trees. Furthermore, the olive oil extraction season is restricted to a limited period of time during the year (November-February). Consequently, OMW removal is difficult and temporary storage is required (Albuquerque et al., 2009). During the last decades, the process used for olive oil extraction has changed in order to increase processing capacity and olive oil extraction yield and reduce labour with respect to the traditional olive pressing process. Currently, the olive oil extraction is based on continuous centrifugation system that, according to the number of separated fractions, can be classified as either two- or three-phase system. The OMW is produced in the three-phase centrifuges and comprises the aqueous fraction of the olive plus water added in different steps of oil production.

The pollutant effect of olive mill wastewater sediments (OMWS) is mainly attributed to its high content in aromatic substances such as tannins and phenolic compounds, which are responsible for the antimicrobial effects and phytotoxicity of OMWS (Babic et al., 2019). Thus, Rodis et al. (2002) estimated that during the olive oil extraction almost all the phenolic content of the olive fruits (98%) remained in the olive mill by-products. Phenols in OMWS group substances of a wide diverse chemical structure, from low molecular weight chemicals to complex compounds of high molecular weight (de la Rosa et al., 2019). They can be classified in two main groups: flavonoids and non-flavonoids, the former being highly bioactive compounds and abundant in fruits and vegetables (Cheynier et al., 2013).

Olive oil extraction generates large amount of wastes in the successive steps of leaf removal, olive washing, grinding, beating, and separation of oil. Currently, most of these wastes are considered by-products with potential for being revalorized within a concept of circular economy (Lieder and Rashied, 2016). However, revalorization of OMWS via cost-effective treatments is a difficult task because of the complex handling and particular characteristics of these hazardous wastes. The uncontrolled disposal of OMW is a serious risk of soil degradation (Albuquerque et al., 2009; Enaime et al.,

2019). Spreading of untreated OMW on soil may cause toxic effects on soil microorganisms and plants, increases soil hydrophobicity, decreases the water retention and filtration rate and affects physical properties of soil (Sierra et al., 2007). Thus, the most usual, cheap and viable system for managing OMW has been its disposal in open evaporation ponds. However, some studies have documented that the long-term storage of OMW effluents leads to be transformed into partially dry, toxic sediments or sludge, in which potentially toxic compounds are concentrated together to organic matter that becomes more recalcitrant (Kavvadias et al., 2017). Another drawback of this management method is the need for large areas to hold the evaporation ponds. In addition, several studies have reported other problems such as the release of unpleasant odors, proliferation of insects (mosquitoes), infiltration that can lead to contamination of soil and groundwater, inhibition of plant growth as well as serious risks for wildlife (Komnitas et al., 2016).

Currently, several methods have been applied to manage OMW wastes, including physico-chemical (El-Abbassi et al., 2014; Enaime et al., 2019) and biological strategies (Aquilanti et al., 2014; Palumbo et al., 2018; Martínez-Gallardo et al., 2019). These technologies have been used in single or combined processes with successful results, but their high cost makes them non-viable for use at large scale (Chowdhury et al., 2013). Besides, these treatments normally have been applied to fresh raw OMW, so techniques of sludge treatment are scarce. Therefore, more research about viable technological procedures to manage these wastes is needed. In this context, bioremediation is a promising alternative for OMWS valorization to obtain an environmentally safe material with potential as a soil amendment. Compared to engineered remediation, bioremediation is a relatively simple and affordable strategy for the *in situ* treatment of abandoned OMW evaporation ponds. For the successful implementation of a bioremediation strategy, a preliminary study of local conditions is required to identify the organic contaminants present in the affected area and the feasibility of the chosen treatment to biodegrade them (Kensa, 2011.). Accordingly, composting has shown to be a feasible way to stabilize OMWS with minimum technical requirements, obtaining an added-value humified product (Tortosa et al., 2012; Martínez-Gallardo et al., 2019). Similar to composting, vermicomposting (i.e., the oxidative decomposition of organic matter using earthworms and microorganisms) is a potential biological strategy to manage OMWS. However, there is a lack of knowledge about quality of vermicompost obtained from OMWS, as well as

the impact of this hazardous waste on the vermicomposting process. Some studies have reported that fresh OMWS is not a suitable feedstock for vermicomposting because of the high content of total phenolic compounds, which result toxic to earthworms (Macci et al., 2010; Campani et al., 2017). However, this side-effect can be alleviated by a partial composting pre-treatment of OMWS aimed to reduce its toxicity (Martínez-Gallardo et al., 2019), thus facilitating the settlement of earthworm population and the stabilization of the residue by vermicomposting.

With the purpose of increasing the understanding on the vermicomposting of OMWS, the aim of this work was to assess the viability of two *in situ* bioremediation strategies based on composting and composting combined with vermicomposting as technological procedures for the valorization of OMWS. In order to accomplish this, the study focused on the following aspects: 1) process assessment, through the enhancement of OMW biodegradability by mixing with other organic materials, and monitoring of the evolution of key properties and thermal profiles of the composting piles during the treatment; 2) process decontamination efficiency by evaluating the reduction of toxic effects in relation to the content of phenolic compounds in OMWS; 3) feasibility of OMWS vermicomposting through the assessment of earthworm population dynamics (survival, density and biomass) and 4) the quality of final products through the analysis of key agronomical parameters such as NPK nutrients content and maturity/stabilization indicators.

2. Material and methods

2.1. Description of the study area and sampling

The area of study was located in Mora (Toledo, Spain) (39° 40' 07.4" N 3° 49' 40.2 W m.s.n.), where there is an OMW evaporation facility with eight evaporation ponds covering a total extension of 25.000 m². In this area, the main olive fruit variety cultivated is Cornicabra, native of this region. Additional details on the study area have been described in a previous work (Martínez-Gallardo et al., 2019). Seven evaporation ponds were sampled and the physico-chemical and chemical characterization was carried out in order to establish the background characteristics of the long-term stored OMW. Eighteen random samples were collected in each pond throughout the profile of OMWS, from the bottom to the top (45 cm).

2.2. Bioremediation strategies

The *in situ* bioremediation strategies were carried out in a partially dried OMW pond (2400 m²). The sediment from the 45-cm top layer was removed using an excavator truck. The chemical characteristics of OMWS were previously determined in order to obtain the necessary information to prepare an adequate initial mixture for composting with a C/N ratio close to 25. The sediment was conditioned with the addition of several types of solid organic wastes to obtain a final material with a C/N ratio around 25. These wastes were obtained from local suppliers placed near to the evaporation pond installation in order to avoid transportation. The organic wastes were spent-mushroom compost (SM), rabbit manure (RM) and chicken manure (CM), which were mixed at the ratio (w/w) of 0.5 : 0.12 : 0.33 : 0.05 (OMWS : SM : RM : CM) and the final volume of the mixture was 183 m³. This ratio was selected to achieve the previously commented criteria (C/N ratio of the mixture close to 25, use of maximum amount of OMWS and use of organic wastes generated in the surrounding area).

Composting process was performed in four trapezoidal composting piles (COMP-1 and COMP-2, in duplicate, respectively) with dimensions of 7.5 x 3.5 x 1.5 m and a total volume of 27 m³ of initial mixture per pile. The piles were periodically watered to adjust the moisture content to 50-60% and turned twice a month until the bio-oxidative phase ended; then the piles were allowed to start the maturation phase. The bio-oxidative phase was considered finished when the pile temperature was close to that of the ambient and reheating did not occur after turning. Samples were collected at the beginning of the process and every 60 days up to the end of the process. Each sample was taken by mixing six sub-samples collected from six different sites around the pile from the top to the bottom.

The vermicomposting process was initiated during the maturation phase (t=188 days) of composting by adding earthworms into a fraction of each pile, obtaining at the end of the process four vermicomposts (VERMI-1 and VERMI-2, in duplicate, respectively). Healthy earthworms were selected from a mixture of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*, respectively, for the process. Some of the material from the compost pile was separated and a smaller pile (7 x 1.3 x 0.4m) was built at the edge of the main pile. Then, non-citellated and citellated earthworms at a density of 2,500/m³ were evenly distributed in this material. In order to ensure an average humidity range of 70-80 %, an

irrigation system was used that consisted of 3 lines with 14 drippers in each vermicomposting pile. During vermicomposting, 2-L samples were taken periodically ($t=0, 28, 58, 78, 113$ and 138 d) from six random sites from the bulk vermicomposting pile to measure earthworm survival, density (number of earthworms/m³) and biomass. Temperature was controlled in order to ensure the mesophilic condition (10-24°C) of the system, which is optimum for earthworm survival and avoiding reheating of the mixture. The total duration of vermicomposting period was 138 days.

2.3. Analytical methods

The samples were air-dried at 45°C to avoid the phenolic compounds degradation, ground to obtain a dust particle size with vibratory ball mill (Frischt Pulverisette SPARTAN), and left at 105°C to constant weight before chemical analysis. Fresh subsamples stored at 4°C were used for the analysis of phytotoxicity and ecotoxicity.

The Electrical Conductivity (EC) and pH were analysed in a 1:10 (w/v) sample:water dilution. Total Carbon (TC) and total Nitrogen (TN) were determined by dry combustion at 1020 °C in automatic microanalyser (EuroVector Elemental Analyzer, Milano, Italy). The organic matter content was determined gravimetrically after the incineration of dry samples at 550 °C for 4 h. The mineralization of organic matter during composting was calculated as the OM losses over the process, according to the equation (1) (Paredes et al., 2000) and subsequently, the results were fitted to a first order kinetic model (2):

$$\text{OM loss (\%)} = 100 - 100 [X_1(100 - X_2)] / [(X_2(100 - X_1))] \quad (1)$$

$$\text{OM loss} = A * (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

Where X_1 and X_2 are the initial and final ash content, respectively, A is the maximum degradation of OM (%), k is the constant degradation rate and t the composting time (days). Residual mean square (RMS) and F-value were calculated to obtain the curve fitting and statistical significance. SigmaPlot 13 software (Systat Software Inc., San Jose, California) was used.

We calculated the exothermic index of the composting pile as EXI^2 (Quadratic Exothermic Index), which is defined as the quadratic sum of the daily difference between

the average temperature of the pile and the ambient temperature, expressed as cumulated temperature (°C) (Vico et al., 2019).

Nutrients and heavy metals were measured in the acid extracts of the samples previously subjected to digestion with HNO₃/H₂O (1:1 v/v). Phosphorus was assessed by colorimetric analysis using the molybdivanadophosphoric acid method (Kitson and Mellon, 1944). Na and K were determined by flame photometry (Jenway PFP7 Flame Photometer). Other nutrient such as Ca, Cu, Mg, Fe Mn and Zn and toxic heavy metals such as Cr, Ni, Cd, Hg and Pb were determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES, Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL, USA).

Humic substances were measured by the alkaline extraction protocol and subsequent fractionation based on solubility at different pH values were used (Ciavatta et al., 1991). A sample previously dried and ground (2 g) was added of 100 mL of 0.1 N sodium pyrophosphate (pH 13) and the mixture was shaken at 120 rpm and 65 °C for 48 h. This suspension was centrifuged (10,000 g, 20 min), the pellet discarded, and the supernatant filtered through cellulose acetate membrane 0.8 µm (Sartorius Group, Göttingen, Germany) to get the total extractable carbon (C_{ex}). A 25-mL aliquot (C_{ex}) was acidified up to pH 1.5 by adding 9 M H₂SO₄ and centrifuged at 5,000·g for 20 min to separate the precipitated humic acid (HA) fraction from supernatant containing non-acid precipitable fraction. HA fraction was re-solubilized by addition of 25 mL of 0.1 M sodium pyrophosphate and the total organic carbon was then measured. Fulvic acids (FA) fraction was obtained after passing the supernatant containing non-acid precipitable fraction through a 5 cm³ polyvinylpyrrolidone (PVP) packed column pre-equilibrated with 0.005 M H₂SO₄. The FA fraction was eluted with 25 mL 0.5 N NaOH. Total organic carbon was measured in HA and FA fractions by using a TOC – VCSN analyzer (Shimadzu Co., Kyoto, Japan).

Water-soluble phenols were determined in a 1:20 water extract (w/v) from samples using Folin-Ciocalteu reagent (Beltrán et al., 1999). Spectrophotometric readings of absorbance were obtained at 765 nm and compared against a standard based on gallic acid. Water-soluble carbon (C_w) was determined in the same water extract using an automatic analyser for liquid samples (TOC-V CSN Analyzer, Shimadzu Co., Kyoto, Japan).

Separation, identification, and quantification of phenolic compounds from samples were determined according to the method described by De Marco et al. (2007). Briefly, a solid-liquid (1:10 w/v) extraction of the samples was carried out as follows: 3 g of sample was added to 30 mL methanol ultrapure grade HPLC and subsequently, the extract was homogenized at 20,000 rpm for 2 min (IKA-Ultra-Turrax T25, Germany). The mixture was subjected to centrifugation at 8,000 rpm for 10 min at 4 °C (Sigma model 3-16 PK, Germany). The solid phase was discarded, and the supernatant was evaporated under vacuum in a rotary evaporator (HEIDOLPH, Laborata 4000-efficient) equipped with a bath adjusted at 50 °C, in order to avoid the phenolic compounds degradation. The dried residue was dissolved in 10 mL methanol by means of sonication (JP Selecta™) and filtered through a 0.45 µm Millipore filter (Millipore corporation, USA). This solution was used for characterization, quantification and fractionation of phenolic compounds. A volume of 20 µl from the filtered solution was injected into a HPLC (HP-Agilent 1200 LC series) using a Mediterranean SEA C18 250 mm x 4.6 mm (TeknoKroma Analitica, Barcelona, Spain) and detected by absorbance at 280, 320 and 360 nm. A mobile phase of water/formic acid (90:10) with an isocratic flow of 1 mL min⁻¹ for 40 min was used to separate phenolic compounds. Identification of the phenolic compounds peaks was done by comparison with those of a standard mixture containing hydroxytyrosol, tyrosol, caffeic acid, luteolin, luteolin-7-glucoside and oleuropein (Extrasynthese, Genay, France).

The germination index (GI) was determined by using *Lepidium sativum* seeds in order to assess the phytotoxicity of the samples, according to the protocol proposed by Zucconi et al. (1985), slightly modified by Martínez-Gallardo et al. (2019). The calculation of GI was performed as follows: $GI = [(GS \times LS) / (Gdw \times Ldw)] \times 100$; where *GS* is the percentage of germinated seeds in the presence of the sample, *Gdw* is the percentage of germinated seed in distilled water, and *LS* and *Ldw* are the mean of radicle elongation (mm) in the presence of the sample and distilled water, respectively.

The ecotoxicity, expressed as units of toxicity (UT), was tested by measuring the inhibition of *Aliivibrio fischeri* bioluminescence with the method of Jarque et al. (2016) and also described by Martínez-Gallardo et al. (2019), using the Aboatox kit (1243-500 BioTox kit). The luminescence changes were measured by using a Luminoskan Ascent Luminometer (Thermo Fisher Scientific). The percentage of luminescence inhibition was calculated as follows: $INH\% = 100 - (IT15 / IT0) \times 100$; where IT15 is the luminescence

(mV) corresponding to test sample after the contact time (15 min); and *ITO* is the initial luminescence (initial luminescence peak) (mV) of the sample. The linear regression line of concentration versus INH% was calculated in order to obtain the EC_{50} (the sample concentration which reduces a 50% of the initial light emitted by the bacteria). Finally, the toxicity units (TU) were obtained as follows $TU = [1 / (EC_{50})] \times 100$ (Sprague and Ramsay, 1965).

2.4. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$) was performed for all variables determined over the experiments. Previously, the data distribution normality of all parameters was verified using Shapiro-Wilk test. Differences between treatments were analysed using the post-hoc Tukey test. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS v.25 software package.

3. Results and discussion

3.1. Enhancement of OMWS biodegradability

Physico-chemical characteristics of the OMWS and the initial mixed feedstock are summarised in Table 1. The OMWS had a high moisture content (58 %) having plastic and oleaginous appearance and scarce porous space, which may contribute to mixture compaction due to its small particle size. Therefore, the OMWS was blended with lignocellulosic materials as bulking agent to create the appropriate physical conditions that facilitate the composting and vermicomposting processes. The OMWS had mean values of organic matter (45.8 %, Table 1), which were lower than those reported by Chowdhury et al. (2013) with a range 70-93%, and Albuquerque et al. (2009) with a range of 93-95 % for OMW obtained from two-phase system. Probably, the long-term storage of this OMWS leads to depletion of easily biodegradable organic compounds, such as simple carbohydrates, fats and amino acids. Total nitrogen (TN) content was also rather low (1.6%) compared to the mean value (2.4%) reported by Macci et al (2010), although it was comparable to the TN content (1.5%) reported by Albuquerque et al., 2009 in similar OMW evaporation ponds than those in our study. As for organic carbon, N losses during long-term storage at relatively high temperatures (typical of the

Mediterranean summer) is the most plausible explanation for this discrepancy among related studies. Conversely, sludge aging seemed to have a different effect on the total polyphenol content. The mean concentration of these chemicals was higher in our sludge samples (20 g kg^{-1}) than that reported for fresh OMW effluent (5.14 g kg^{-1}) (Enaime et al., 2019), which suggests a resistance of these substances to biodegradation when concentrated in sediments.

Table 1. Main characteristics of the OMWS and the raw materials used in this study.

Material	^a Volume (m^3)	Moisture (%)	OM (%)	C (%)	N (%)	Bulk density (t m^{-3})	Polyphenols (mg kg^{-1})
OMW	73 (40)	58	45.8	30	1.6	0.80	19996
Rabbit manure	68 (37)	63	73.7	48	1.2	0.40	4809
Spent mushroom compost	27 (15)	75	78.3	46	0.6	0.35	2008
Chicken manure	15 (8)	13	29.7	46	2.3	0.50	3356
Initial mixture	183 (100)	50	37.3	C/N = 25		0.60	6086

^a Volume of fresh material, percentage proportion between parenthesis. OMWS: olive mill wastewater sediment; OM: organic matter

3.2. Thermal composting profile

Thermal profile of composting pile is considered a key variable since it is directly linked to microbial activity, which is the major driver of the composting process (De Bertoldi et al., 1983; Martínez-Gallardo et al., 2019). Figure 1 shows that the temperature profile of the composting process. During the first 20 days of composting, the mean temperature remained below 40°C in the four piles, but it increased after the first turning of the piles, to reach the typical thermophilic range ($>40^\circ\text{C}$), which was maintained for the next 3 months. A similar thermal profile was reported in the composting of two-phase OMWS mixed with poplar sawdust and bark chips (Filippi et al., 2002), and in co-composting with grape stalk and olive leaf under forced aeration conditions (Alburquerque et al., 2006). In these studies, the slow rise of the temperature was justified by the excess of moisture in OMWS. The presence of recalcitrant components in those feedstocks makes difficult the initial bio-activation, and the scarce porosity of the matrix, which may result in a blocking of airflow into the mixture causing anaerobic conditions.

The piles did not achieve during the process the temperature requirements established in the European legislation to ensure compost sanitation (Regulation (EU) 2019/1009), since the temperature values did not reach values ≥ 55 °C at least for two weeks. However, the final materials fulfilled the requirements established in the previously commented legislation concerning pathogen contents (absence of *Salmonella* spp. in 25 g of product and < 1000 CFU/g product of *E. coli*) (data not shown). During the 266 days of composting, a total of 10 turnings were carried out. The last turning was performed on day 172 and no temperature increase could be detected thereafter, which was interpreted as the end of the bio-oxidative phase. The thermal profile showed by OMWS and the physical characteristics exhibited by the mixture suggest that care should be taken to maintain a correct temperature in each phase, as microbial activity could be limited. Therefore, the need for mechanical turning requirement and labour was higher than that for the composting of other organic material such as livestock manure. When the bio-oxidative phase ended, the piles were left to mature over 3 months. From that moment, the temperature ranged between 10 and 20 °C until the end of the process (Figure 1). According to Palsania et al. (2008) this temperature range is adequate for optimal earthworm growth. The EXI2 index increased more slowly compared to other studies (Pelegrin et al., 2018; Vico et al., 2018) probably because of the slow initial activation of the process (Figure 1, Table 2). The EXI2 was stabilized after 150 days of composting. Similar results in the four piles were obtained concerning the duration of the bio-oxidative phase and the ratio EXI2/bio-oxidative phase duration (Table 2). In a review about several olive mill composting processes, Chowdhury et al. (2013) showed differences in the maximum temperatures reached and the length of the bio-oxidative phase, and suggested these variations could be attributed to four factors: the composition of initial mixture, the aeration, the volume of the compost pile, and the different types of olive mill waste. Thus, our results suggest that the selected organic wastes, the proportions in which they were mixed with OMWS as well as the operational management facilitated the thermophilic phase for at least 3 months

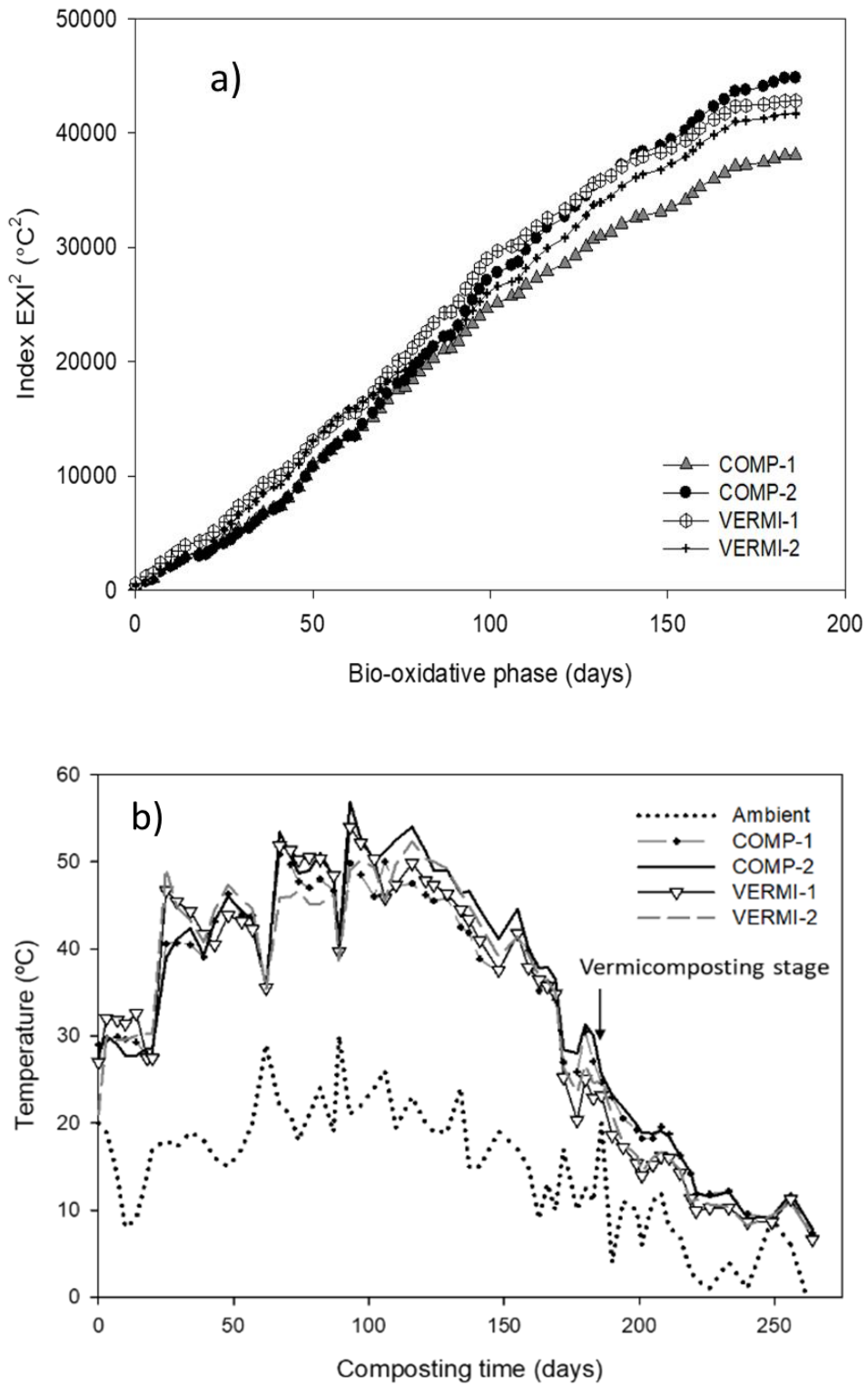


Figure 1. a) Evolution of the cumulative values of quadratic exothermic index (EXI²) during the bio-oxidative stage and b) thermal profile of the piles.

Table 2. Indicators of the exothermic behaviour of the studied composting processes.

Parameter	COMP-1	COMP-2	VERMI-1	VERMI-2
EXI ² Index (°C ²)	38058	44813	42819	41695
Days in bio-oxidative phase/days >40°C	186/45	186/47	177/50	177/51
Ratio EXI ² /days in bio-oxidative phase	205	241	242	236

EXI²: quadratic exothermic index (quadratic sum of the daily difference between the average temperature of the pile and the ambient temperature).

3.3. Evolution of physico-chemical and chemical properties of (vermi) composting

Table 3 summarizes the evolution of selected physico-chemical parameters during composting and vermicomposting. The initial feedstock had pH values that varied between 6 and 8, which is a range considered optimal for composting (Bernal et al., 2009). However, pH increased in all composting piles at the end of the process reaching values of 9.71, 9.65 for COMP-1 and COMP-2, respectively. Similarly, the piles in which vermicomposting was implemented (VERMI-1 and VERMI-2), pH decreased at the end of the bio-oxidative phase, reaching a mean value of 9.0. The slight lower pH value in vermicomposting piles could be due to increased moisture content that neutralize the pH of the substrate (Ansari and Sukharaj, 2010). The values of pH obtained in our work were within the optimal range for *E. fetida* (Pérez-Godinez et al., 2017), although higher than the threshold (7.0-8.5) for agricultural use (Masó and Bonmati, 2008). An explanation for the alkalization of substrate during composting could be quality of organic matter in the substrate. The absence of sugars or simple organic acids, together to the protein content of the raw materials and those proteins derived from microbial mortality, can be actively used by the microbiota that utilizes the carbon fraction of the amino acids as energy source, therefore releasing ammonia which, in turn, triggers a rise in pH.

Table 3. Evolution of physico-chemical and chemical characteristics at the different stages of composting and vermicomposting.

Composting Stage	pH	EC (dS m ⁻¹)	OM (%)	TOC (%)	TN (%)	C _w (g kg ⁻¹)	Total Phenols (mg kg ⁻¹)
COMP-1							
Start-up	7.52 a	4.97 d	38.1 d	23.8 c	1.34 c	5.22 ab	6086 d
Thermophilic	9.58 b	3.33 c	19.5 c	9.67 c	0.80 b	7.41 c	3069 c
Middle bio-oxidative	9.73 c	2.66 b	13.4 c	8.25 ab	0.69 ab	4.00 a	3057 c
End bio-oxidative	9.75 c	2.24 a	11.1 a	6.04 a	0.59 a	5.42 b	2263 ab
Maturity	9.71 c	2.45 ab	12.5 b	5.85 a	0.58 a	11.02 d	1616 a
F-ANOVA	*** 2974	*** 423	*** 1449	*** 203	*** 99	*** 85	*** 92
COMP-2							
Start-up	7.52 a	4.97 c	38.1 d	23,8 c	1.34 d	5.22 a	6086 c
Thermophilic	9.39 b	2.62 b	19.2 c	10.4 b	0.92 c	7.42 c	2056 a
Middle bio-oxidative	9.79 d	2.09 a	10.9 a	6.24 a	0.48 a	4.39 a	2465 ab
End bio-oxidative	9.46 b	2.64 b	13.7 b	8.08 ab	0.84 b	6.25 b	3131 b
Maturity	9.64 c	2.60 b	12.4 b	5.81 a	0.56 a	7.56 c	2225 a
F-ANOVA	*** 2447	*** 413	*** 1566	*** 196	*** 57	*** 43	*** 89
VERMI-1							
Start-up	7.52 a	4.97 d	38.1 d	23.87 b	1.34 b	5.22 b	6086 d
Thermophilic	9.45 d	2.61 c	16.7 c	8.43 a	0.68 a	6.93 d	2760 b
Middle bio-oxidative	9.69 e	2.76 c	14.9 b	6.98 a	0.61 a	6.36 c	3587 c
End bio-oxidative	8.99 b	1.50 b	14.5 b	5.89 a	0.58 a	6.48 cd	1221 a
Maturity	9.24 c	0.62 a	13.5 a	6.17 a	0.57 a	4.31 a	468 a
F-ANOVA	*** 5815	*** 1010	*** 1639	*** 194	*** 84	*** 103	*** 164
VERMI-2							
Start-up	7.52 a	4.97 d	38.1 d	23.87 c	1.34 d	5.22 b	6086 c
Thermophilic	9.35 d	2.49 c	17.41 b	8.63 b	0.69 ab	6.83 c	3081 b
Middle bio-oxidative	9.74 e	2.45 c	15.24 b	9.14 b	0.78 b	5.18 b	2702 b
End bio-oxidative	9.22 c	1.23 b	18.98 c	10.65 b	1.00 c	3.18 a	1041 a
Maturity	8.94 b	0.39 a	14.15 a	6.65 a	0.62 a	3.95 a	316 a
F-ANOVA	*** 3255	*** 1202	*** 1416	*** 175	*** 88	*** 33	*** 169

EC: Electrical conductivity, TOC: total organic carbon, OM: organic matter, C_w: water-soluble carbon. ***: significant at $P \leq 0.001$). Average values (n=4). Within a column, values followed by the same letter are not statistically significant at $P < 0.05$ according to Tukey-b test.

The trend observed in electrical conductivity (EC) was similar during the bio-oxidative phase of composting in the four piles, showing an increase from day 0 to day 150 of the process. Then, in vermicomposting piles a sharp decrease was observed up to the end of the process. This decrease could be due to volatilization of ammonia and formation of insoluble salts (Huang et al., 2004). In addition, the moisture maintenance by drip irrigation may contribute to EC loss by leaching and/or microbial salts immobilization (Plaza et al., 2008). The reduction of salinity during vermicomposting was clearly higher than in the composting process (approximately 87-90% in relation to the initial value). Thus, the final EC values obtained in the four piles did not exceed the threshold of 4 dSm⁻¹ considered adequate in compost and vermicompost for plant cultivation (Lasaridi et al., 2006).

Throughout the composting process, water-soluble carbon is quickly consumed by microorganisms (Bustamante et al., 2012). Some studies have documented that composting of lignocellulose-rich materials such as OMW (Albuquerque et al., 2009; Tortosa et al., 2012) generates an increase of water soluble carbon because of the transformation of these complex substrates in soluble low molecular weight compounds (Gigliotti et al., 2012). This general observation is also observed in our study, in which the water-soluble carbon content increased during the composting process in all piles (Table 3). With the exception of the COMP-1 pile, the water-soluble carbon content in the final product was less than 10 g kg⁻¹, which is considered the threshold for mature composts (Zmora-Nahum., 2005).

Degradation of OM in the composting process is exclusively a biological process whereby different types of microorganisms use organic molecules of the substrate as nutrients in the different stages of the process (Jurado et al., 2015). The OM losses throughout the process were noticeable in all the piles showing similar values of potentially mineralizable OM (Fig. 2). These values were higher than the range (55-68%) reported by Chowdhury et al. (2013) in a study using olive mill as feedstock of co-composting. The profile showed a greater OM loss during the initial stage (days 0 to 50). The degradation rate gradually decreased as composting progressed in accordance with the consumption of available carbon sources and the stabilization of the substrate. The constant K showed higher values in the vermicomposting piles than in the two composting piles, probably due to the activity of earthworms during the maturation phase (Figure 2). Feeding and casting of earthworms in the substrate contribute to alter and disperse the

microbial communities of the substrate, therefore favouring the stabilization of organic carbon (Domínguez, 2011).

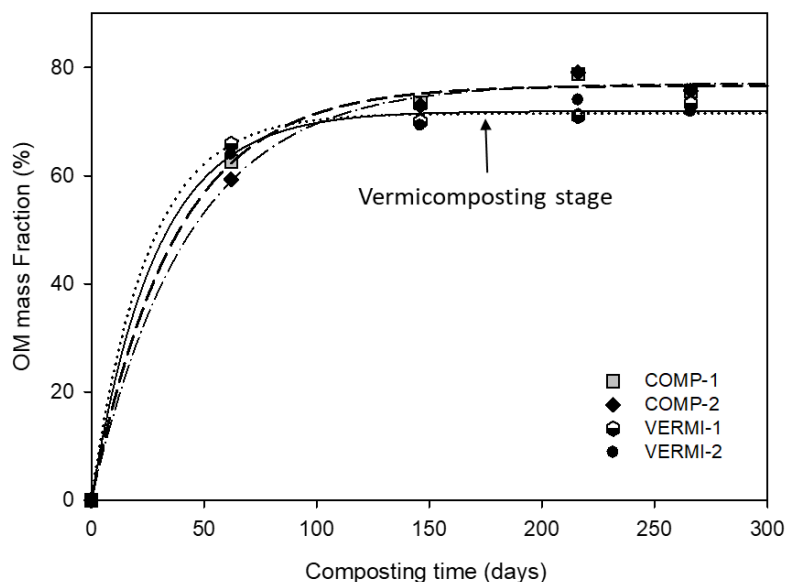


Figure 2. Organic matter (OM) losses (%) in the composting piles. Lines represent curve fitting.

3.4. Evolution of the phenolic compounds and OMWS toxicity

The efficacy of both composting and vermicomposting as bioremediation strategies to manage OMWS was evaluated by measuring the concentration of phenolic compounds, and the ecotoxicity and phytotoxicity of the final composts.

As expected, the mixture of OMWS with multiple organic bulking materials caused a dilution effect, which decreased the total phenolic concentration from 19,996 mg kg⁻¹ in OMWS to 6,086 mg kg⁻¹ in the initial mixture. Nevertheless, the concentration of phenolic compounds detected in OMWS were higher than those reported by others (Table 1). For example, Enaime et al. (2019) recorded 5140 mg kg⁻¹ of total phenol compounds in an OMW fresh effluent from the olive mill in Marrakech, while Kavvadias et al. (2017) found a content of phenolic compounds of 13,400 mg kg⁻¹ in OMW stored in evaporation ponds. These differences in the phenol concentrations could be attributed to the long-term, open-air storage that leads to the concentration of toxic compounds such as phenolics due to water loss. Additionally, other potential factors that may influence the phenolic concentration of OMWS are olive tree cultivation techniques, pedoclimatic

factor, fruit ripening or even plant genetics (Inglese et al., 2011) as well as the different techniques for olive oil extraction. The general trend in the four piles shows a sharp decrease in phenolic compounds in the early stage of composting once the temperatures had reached thermophilic values, followed by a deceleration in the degradation rate up to reach concentrations around 2,000 mg kg⁻¹ in composting or 400 mg kg⁻¹ in vermicomposting (Figure 3).

A similar trend was obtained in the evolution of ecotoxicity, expressed as toxicity units (TUs) in the four composting piles (Figure 3). The initial mixture showed TU values above 5, which is considered as acute toxicity level according to Ecotoxicity classification by Persoone et al. (2003). However, TU values progressively decreased since the beginning of the processes until reaching values between 1 and 0.4 TU in composting piles, which is considered slight toxic, and lower than 0.4 TU in vermicomposting piles, which is considered nontoxic. These results suggest that toxicity of OMWS were primarily due to phenolic compounds as evidenced by the similar trends between phenolic dissipation and TU. This assumption is supported by other studies (Babic et al., 2019), which link toxicity of OMWS to phenolic concentrations. The rapid decrease of phenolic compound in the first weeks of composting is due mainly to microbial intervention. For example, exoenzymes such as polyphenoloxidase released by the fungus *Aspergillus* spp. are involved in the decomposition of phenolic compounds during the thermophilic phase of composting (Chowdhury et al., 2013). However, both the concentration of phenolic compounds and the TU values slightly increased at maturation phase (Figure 3). This finding could be due to releasing of small-sized molecules such as phenols derived from metabolizing lignocellulosic polymers (Jurado et al., 2015). Interestingly, the inoculation of substrate with earthworms caused a significant decreased of phenolic compounds and their toxicity respect to composting alone. Addition of earthworms in composting piles generally triggers a microbial proliferation of the substrate that accelerate the OM decomposition (Macci et al., 2009), and the degradation of phenolic substances (Masciandaro et al. (2010); both effects were corroborated in our study.

Germination index was 49% for the initial mixture (Table 4), which represents a value of phytotoxicity according to Zucconi et al. (1985) and Emino and Warman (2004). These data agree previous studies that reported untreated OMWS inhibit seed germination and early plant growth (Hentati, 2016). Such an inhibitory effect is caused by the combination of synergistic or additive effects of organic compounds other than

polyphenols, and the acidic pH and high salt content (Pierantozzi et al., 2011). However, GI values increased to 112–129% in the composting piles and up to 99.7–100% in the vermicomposting piles, clearly indicating a decrease in the phytotoxicity capacity of the final (vermi) composts. The GI increase is in accordance to the ecotoxicity and phenolic compound outcomes (Figure 3), therefore it is concluded that the primary cause of OMWS phytotoxicity was the presence of phenolic compounds as suggested by other studies (Enaime et al., 2019; Martínez-Gallardo et al., 2019).

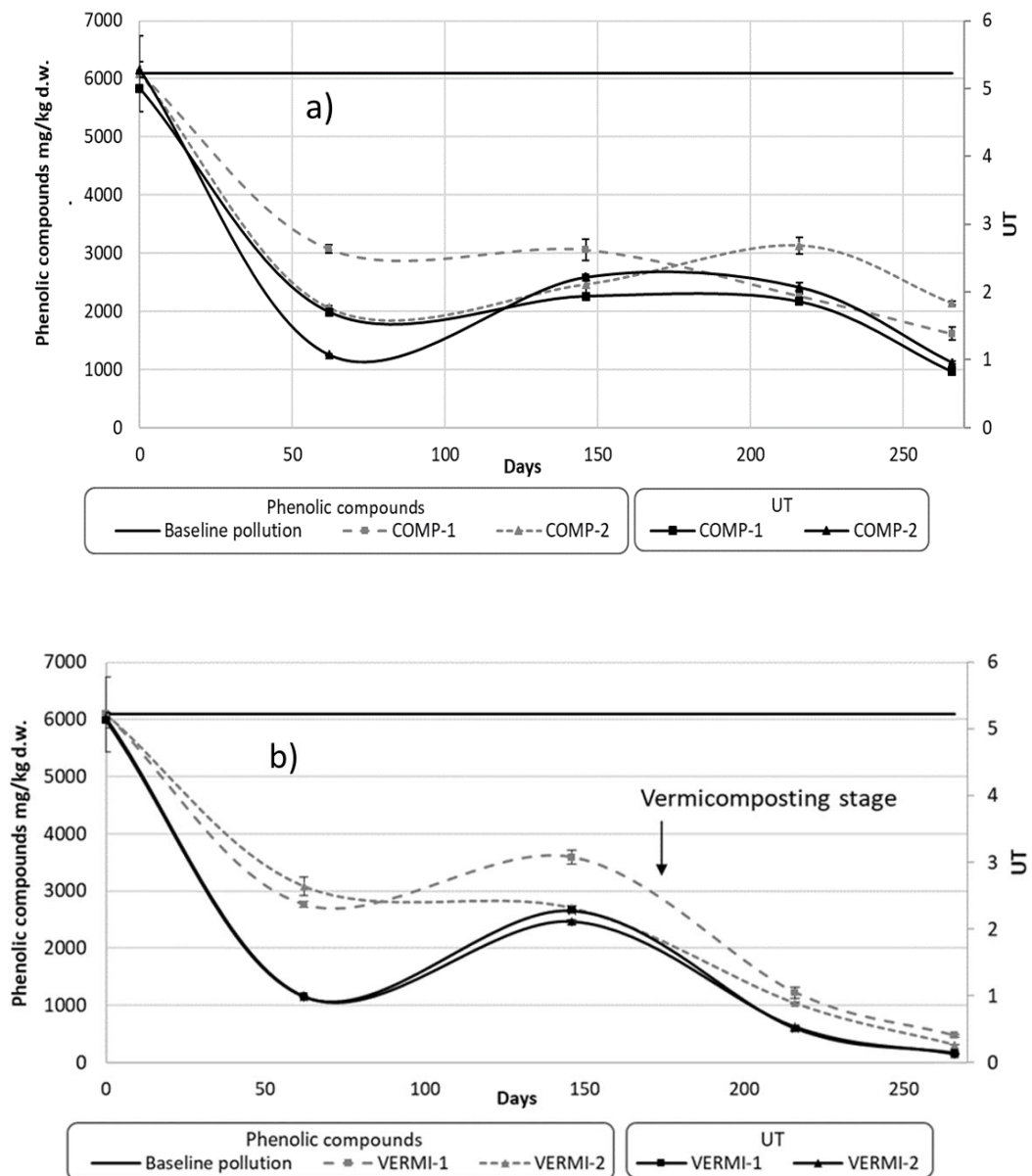


Figure 3. Evolution of phenolic compounds and Toxicity Units (UT) determined during a) composting and b) composting combined with vermicomposting.

Table 4. Chemical characteristics of the initial mixtures and final products obtained from composting and vermicomposting processes.

Composting stage	Macronutrients		Micronutrients			Maturity parameters			
	(g kg ⁻¹)		(g kg ⁻¹)			CEC (meq 100 g ⁻¹ OM)	C _{AH} (%)	C _{ex} /TO C	GI (%)
P ₂ O ₅	K ₂ O	Na	Fe	Ca					
Start up	9.95	15.9	5.84	6.64	8.75	103	4.2	0.33	49
COMP-1	7.02	24.2	4.12	9.30	7.32	258	3.9	0.39	117
<i>F-ANOVA</i>	***266	***106	***1069	**84	**24	***669	*15	n.s.	
COMP-2	6.42	25.4	4.22	9.12	6.92	294	5.7	0.39	129
<i>F-ANOVA</i>	***118	***809	***115	**27	*19	***459	*22	n.s.	
VERMI-1	7.73	11.5	2.41	8.66	12.48	256	8.0	0.32	99
<i>F-ANOVA</i>	**74	**68	***813	**63	*15	***533	**36	n.s.	
VERMI-2	7.64	9.9	1.52	9.06	14.35	274	6.9	0.31	100
<i>F-ANOVA</i>	**27	***482	***4170	**36	**46	***205	**43	n.s.	

CEC: Cation exchange capacity, C_{ex}: Total extractable carbon, C_{AH}: humic acid-like carbon, GI: Germination index. n.s., *, **, ***: indicate not significant, statistically significant at P≤0.05, P≤0.01 and P≤0.001, respectively. Average values (n=4). Within a column, values followed by the same letter are not statistically significant at P<0.05 according to Tukey-b test.

3.5. Earthworm population dynamics

We found a significant increase of earthworm density three weeks after vermicomposting was initiated (Figure 4), indicating the favourable conditions of the matured compost to earthworm reproduction (Rékási et al., 2019). Our results are in agreement with those by He et al. (2016), who demonstrated that the first 20 days of vermicomposting correspond to the average time necessary for earthworm acclimatization. Additionally, it has been reported that OMWS is not an optimum environment for the reproduction of epigeic earthworms, since it contains toxic compounds, in particular high concentration of NH_4^+ and phenolic compounds (Macci et al., 2010). However, in the present work, the addition of different organic amendments and the previous composting step significantly reduced the potential toxicity of untreated OMWS. The number of earthworms progressively increased up to 90 days. After this period of time, the earthworm density kept unchanged or slightly decreased probably because of nutrient exhaustion. It is known that earthworms consume half of their weight per day (Malinska et al., 2016), so the total dry weight of the brood material was sufficient up to approximately 90 days, assuming that the total amount of organic material is edible for earthworms. In addition, the biomass of earthworms increased about 550 % in VERMI-1, whereas in VERMI-2 augmented by 450 % (Figure 4). This slight difference could be due to the variety of uncontrolled conditions that *in situ* vermicomposting implies since in the VERMI-2 pile, unlike VERMI-1, a sharp decrease in total nitrogen was detected at the end of the composting bio-oxidative phase, when the earthworms were introduced. Moreover, the difference in earthworm biomass could be also explained by the morphological and probably metabolic differences between *E. fetida* and *E. andrei*. In this context, other authors argued that mature earthworms were affected by C/N ratio, suggesting that under low C/N conditions the earthworms invest more energy in growth than in reproduction (Gunadi et al., 2003; Aria et al., 2006). On the other hand, it has been reported by Fornes et al. (2013) that the food quality has effect on growth and reproduction rates of *Eisenia andrei* provoking to invest preferentially their energy either to growth or to reproduction.

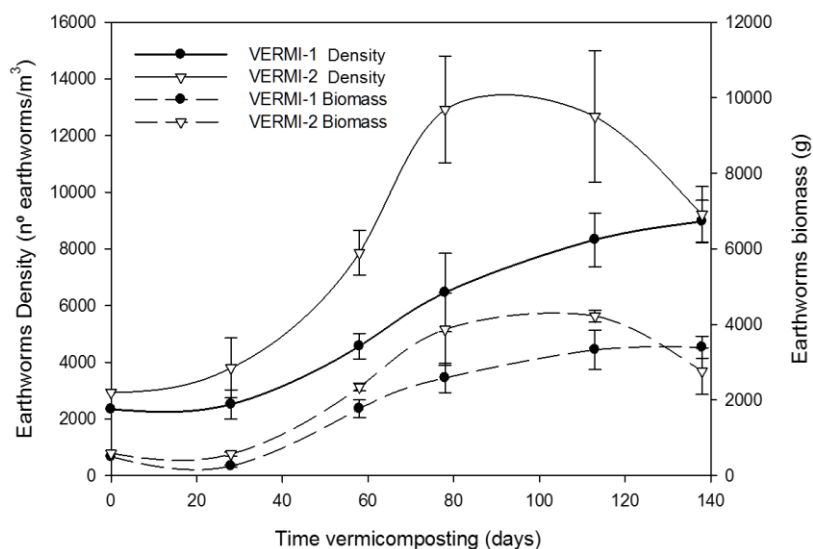


Figure 4. Evolution of number and weight of the earthworms during the vermicomposting process. Vertical bars indicate \pm standard error.

3.6. Quality and agronomic value of final products

The humic-like substances comprise humic acids (HA) and fulvic acids (FA) and are usually expressed as extracted organic carbon (Cex) by alkaline protocols. According to Gigliotti et al. (2012) the composting process exhibits a reduction of Cex from 18.6% to 12.8%. In our study, the Cex/TOC ratio remained without significant changes during composting as shown in Table 4. Therefore, the Cex decreased in the same proportion of TOC, higher than that observed by Gigliotti et al. (2012). This higher reduction in Cex during OMWS composting could be explained by the fact that alkaline extraction lead to co-extraction of a heterogeneous mixture of non-humic compounds such as aromatic compounds (phenolic, tannins, etc.) present in higher concentration in the initial mixture of composting (Kavvadias et al., 2010). This reduction is greater than that observed by Gigliotti et al. (2012) in olive husk composting since its aromatic content is much lower than that in olive oil mill wastewater. In the opposite, the HA fraction increased in all piles, except in COMP-1, which is in agreement with Albuquerque et al. (2009) since they reported similar results and showed how the humification process during OMWS composting was mainly caused by the lignocellulosic degradation in the thermophilic phase. There were significant differences among C_{AH} values of final products from composting and vermicomposting. The concentration in final vermicompost was above

or close to 7 %, the minimum values considered as stabilized (Chowdhury et al., 2013) in high quality soil amendments, while compost piles exhibited C_{AH} concentration below 7%. These results indicate that the biotransformation occurring during composting and especially during vermicomposting stage leads to well humified organic material. This fact corresponding with the ability of earthworms to improve the humification process. It is known that the earthworm activity promotes the formation of polymerized compounds through the enzymatic contents of their cast (Macci et al., 2010), improve the soil fertilization and prevent soil mineralization. The GI also showed great differences among the final materials. It is worth mentioning that GI was higher in final compost than in vermicompost which demonstrates a higher phytostimulant activity of compost.

4. Conclusions

Bioremediation strategies such as *in situ* composting and composting combined with vermicomposting were effective to solve the environmental issues associated to OMWS toxicity. Both treatments proved to be successful in decontaminating and recycling the sludge into well-balanced products suitable for their safe use in agriculture. Composting technique assisted with earthworms speeds up the depletion of phenolic compounds and OMWS ecotoxicity more than composting, vermicomposting being more effective in the reduction of the phenolic compounds, especially during the maturation stage. In addition, vermicomposting was more effective in the reduction of the OMWS salinity. However, the final product from composting had higher phytostimulant properties than vermicompost. In addition, current results showed that a pre-composting process of the OMWS is needed before vermicomposting in order to provide adequate physico-chemical and chemical characteristics that ensure the survival and activity of earthworms.

Acknowledgments

This research has been funded by the project LIFE+REGROW (LIFE16 ENV/ES/000331) “Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons using bio-recovering strategies in a circular economy scenario”. The authors also thanks to Mora

municipality (Toledo, Spain) and to GESREMAN Company for their help and support activities during the field trials in the evaporation ponds of OMW.

5. References

Aira, M., Monroy, F., Domínguez, J., 2006. C to N ratio strongly affects population structure of *Eisenia fetida* in vermicomposting systems. *Eur. J. Soil Biol.* 42, S127–S131.

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2006. Effects of bulking agent of the composting of “alperujo” the solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Process Biochemistry* 41, 127,132.

Alburquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Ait Baddi, G., Cegarra, J., 2009. Evaluation of “alperujo” composting base don organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation.* 20, 257-270.

Ansari, A.A., Suhkraj, K. 2010. Effect of vermiwash and vermicompost on soil parameters and productivity of okra (*Abelmoschus esculentus*) in Guayana. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(14), pp. 1794-1798.

Aquilanti L., Taccari M., Bruglieri D., Osimani A., Clementi F., Comitini F., Ciani, M. 2014. Integrated biological approaches for olive mill wastewater treatment and agricultural exploitation. *Int Biodeterior Biodegrad.* 88, 162-168.

Babić, S., Malev, O., Pflieger, M., Lebedev, A.T., Mazur, D.M., Kužić, A., Trebše, P., 2019. Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays. *Sci. Total Environ.* 686, 903-914.

Beltrán, F.J.; García-Araya, J.F.; Álvarez, P.M. 1999. Wine Distillery Wastewater Degradation. 1. Oxidative Treatment Using Ozone and Its Effect on the Wastewater Biodegradability. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3911–3918.

Bernal, M.P., Alburquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100, 5444-5453.

Bustamante, M.A., Alburquerque, J.A., Restrepo, A.P., de la Fuente C., Paredes, C., Moral, R., Bernal, M.P. 2012. Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass and Bioenergy* 43, 26-35.

Campani, T., Caliani, I., Pozzuoli, C., Romi, M., Fossi, M. C., & Casini, S. (2017). Assessment of toxicological effects of raw and bioremediated olive mill waste in the earthworm *Eisenia fetida*: A biomarker approach for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 119, 18-25.

Cheyrier, V., Comte, G. Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens, S. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant. Physiol. Biochem* 72, 1-20.

Chowdhury, A.K.M.M.B., Akrotos, C.S., Vayenas, D.V., Paylou, S. 2013. Olive mill waste composting: a review. *Inter. Biodeterior, Biodegradation* 85, 108-119.

Ciavatta, C., Govi, M., Vittori Antisari, L., Sequi, P., 1991. Determination of organic carbon in aqueous extracts of soils and fertilizers. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22, 795–807.

De Bertoldi, M., Vallini, G., Pera, A., 1983. The biology of composting: a review. *Waste Management & Research* 1, 157e176.

de la Rosa, L.A., Moreno-Escamilla, J.O., Rodrigo-García, J., Alvarez-Parrilla, E. 2019. Chapter 12. Phenolic compounds in Book *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* edited by Yahia, E.M. and Carillo.López, A. Woodhead Publishing. ISBN 978-0-12-813279.

De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., Sacchi, R., 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry* 104, 858–867.

Domínguez, J., 2011. *The Microbiology of Vermicomposting*. In: *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*; Edwards, C.A., Norman, Q. A., Sherman, R., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, pp 53–66.

El-Abbassi A., Kiai H., Raiti, J., Hafidi A. 2014. Application of ultrafiltration for olive processing wastewaters treatment. *Journal Clean Production*. 65, 432-438.

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

Enaime, G., Baçaoui, A., Yaacoubi, A., Belaqziz, M., Wicherm, M., Lübken, M. 2019. Phytotoxicity assessment of olive mill wastewater treated by different technologies: effect on seed germination of maize and tomato. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06672-z>.

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. *Bioresour. Technol.* 118, 296–305.

Galliou, F., Markakis, N., Fountoulakis, M.S., Nikolaidis, N., Manios, T. 2018. Production of organic fertilizers from olive mill wastewater by combining solar greenhouse drying and composting. *Waste Manag.* 75, 305-311.

Gigliotti, G., Proietti, P., Said-Pullicino, D., Nasini, L., Pezzolla, D., Rosati, L., Porceddu, P.R. 2012. Co-composting of olive husk with high moisture contents: Organic matter dynamics and compost quality. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 67, 8-14.

Gunadi, B., C.A. Edwards, C. Blount, The influence of different moisture levels on the growth, fecundity and survival of *Eisenia foetida* (Savigny) in cattle and pig manure solids, *Eur. J. Soil Biol.* 39 (2003) 19–24.

He, X., Zhang, Y., Shen, M., Zeng, G., Zhou, M., Li, M., 2016. Effect of vermicomposting on concentration and speciation of heavy metals in sewage sludge with additive materials. *Bioresour. Technol.* 218, 867–873.

Hentati, O., Oliveira, V., Sena, C., Bouji, M.S.M., Wali, A., Ksibi, M., 2016. Soil contamination with olive mill wastes negatively affects microbial communities, invertebrates and plants. *Ecotoxicology* 25(8), 1500-1513.

Huang, G., Wong, J., Wu, Q. 2004. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Management* 24(8) 805-813.

Inglese, P., Fomiuni, F., Galvano, F., Servili, M., Esposto, S. Urbini, S. 2011. Factors extra-virgin olive oil composition. *Hortic. Rev.* 38, 83-147.

Jurado, M.M., Suarez-Estrella, F., Lopez, M.J., Vargas-Garcia, M.C., Lopez-Gonzalez, J.A., Moreno, J., 2015. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Biores. Tech.* 186, 15-24.

Kavvadias, V., Elaiopoulos, K., Theocharopoulos, S., Soupios, P., 2017. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. *Bull. Environmental. Contam. Toxicol.* 98 (3), 323-330.

Kensa, V.M. 2011. Bioremediation- An Overview. *Journal of Industrial Pollution Control* 27 (2), 161-168.

Kitson, R.E., Mellon, M.G., 1944. Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 16, 379-381.

Komnitas, K., Modis, K., Doula, M., Kavvadias, V., Sideri, D., Zaharali, D. 2016. Geostatistical estimation of risk for soil and water in the vicinity of olive mill wastewater disposal sites. *Desalin. Water Treat.* 57 (7), 2982-2995.

Lasaridi, K., Protopapa, I., Kotsou, M., Pilidis, G., Manios, T., Kryacou, A. 2006. Quality assessment of compost in the Greek market: the need for standards and quality assurance. *Journal of Environmental Management.* 80, 58-65.

Lieder, M., Rashid, A., 2016. Towards circular economy implementation: a comprehensive review in context of manufacturing industry. *Journal of Cleaner Production*, 115, 36-51.

Macci, C., Masciandaro, G., and Ceccanti, B., 2010. Vermicomposting of olive oil mill wastewater. *Waste Manag. Res.* 28: 738-747.

Malinska, K., Zabochnicka-Swiatek, M., Cáceres, R., Marfàb, O., 2016. The effect of precomposted sewage sludge mixture amended with biochar on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* during laboratory vermicomposting. *Ecol. Eng.* 90, 35–41.

Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J. 2019. Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Science of the total Environment.* 703, 135537.

Masciandaro, G., Macci, C., Doni, S., Ceccanti, B. 2010. Use of earthworms (*Eisenia fetida*) to reduce phytotoxicity and promote humification of pre-composted olive oil mill wastewater. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1879-1885.

Masó, M.A., Bonmati, A. 2008. Evaluation of composting as strategy for managing organic wastes from a municipal market in Nicaragua. *Bioresource Technology* 99, 5120-5124.

Palsania, J., Sharma, R., Srivastava, J.K., Sharma, D. 2008. Effect of moisture content variation over kinetic reaction rate during vermicomposting process. *Applied Ecology and Environmental Research* 6(2), 91-93022

Palumbo, G., Schiavon M., Nardi, S., Ertani, A., Celano, G., Colombo, C.M., 2018. Biostimulant Potential of Humic Acids Extracted From an Amendment Obtained via Combination of Olive Mill Wastewaters (OMW) and a Pre-treated Organic Material Derived From Municipal Solid Waste (MSW). *Frontiers in Plant Science* 9, 1028.

Paredes C, Roig A, Bernal MP, Sánchez-Monedero MA, Cegarra J. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol Fert Soils* 32(3), 222e

Pelegrín M., Sáez J.A., Andreu-Rodríguez, J., Pérez-Murcia M.D., Martínez-Sabater E., Marhuenda-Egea F.C., Pérez-Espinosa A., Bustamante M.A., Agulló E., Vico A., Paredes C., Moral R. 2018. Composting of invasive species *Arundo donax* with sewage and agri-food sludge: Agronomic, economic and environmental aspect. *Waste management* 78, 730-740.

Pérez-Godinez, E.A., Lagunes-Zarate, J., Corona-Hernández, J., Barajas-Aceves, M. 2017. Growth and reproductive potential of *Eisenia foetida* on various zoo animal dungs after two methods of pre-composting followed by vermicomposting. *Waste Management*. 64, 67-78

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Kolar, B., 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology* 18(6), 395-402.

Pierantozzi, P., Zampini, C., Torres, M., Isla, M., Verdenelli, R., Merilesa, J. Maestria, D. 2011. Physicochemical and toxicological assesment of liquid wastes from olive processing-relates industries. *Journal Science Food Agric*. 92, 216-223.

Plaza, C., Nogales, R., Senesi, N., Benitez, E., Polo, A. 2008. Organic matter humification by vermicomposting of cattle manure alone and mixed with two phase olive pomace. *Bioresource Technology* 99, 5085-5089.

Rékási, M., Nikolett Mazsu, Eszter Draskovits, Botond Bernhardt, Anita Szabó, Pierre-Adrien Rivier, Csilla Farkas, Barbara Borsányi, Béla Pirkó, Sándor Molnár, György Kátay, Nikolett Uzinger. 2019. Comparing the agrochemical properties of compost and vermicomposts produced from municipal sewage sludge digestate. *Bioresour. Tech*. 291, 121886

Rodis, P.S., Karathanos, V.T. Mantzavinou, A., 2002. Partionating of olive oil antioxidants between oil and water phase. *Journal Agricultural Food Chemical* 50 (3), 596-601.

Sierra, J., Marti, E., Garau, A.M., Cruañas, R. 2007. Effects of the agronomic use of olive oil mil wastewater: field experiment. *Sci. Total Envrion*. 378, 90-94

Sprague, J.B., Ramsay, B.A., 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. *J. Fish. Res. Board. Can*. 22(2), 425-432. <https://doi.org/10.1139/f65-042>.

Tortosa, G., Alburquerque, J.A., Ait-Baddi, G, Cegarra, J. 2012. The production of comercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste (“alperujo”). *Journal Clean. Prod.* 26, 48-55.

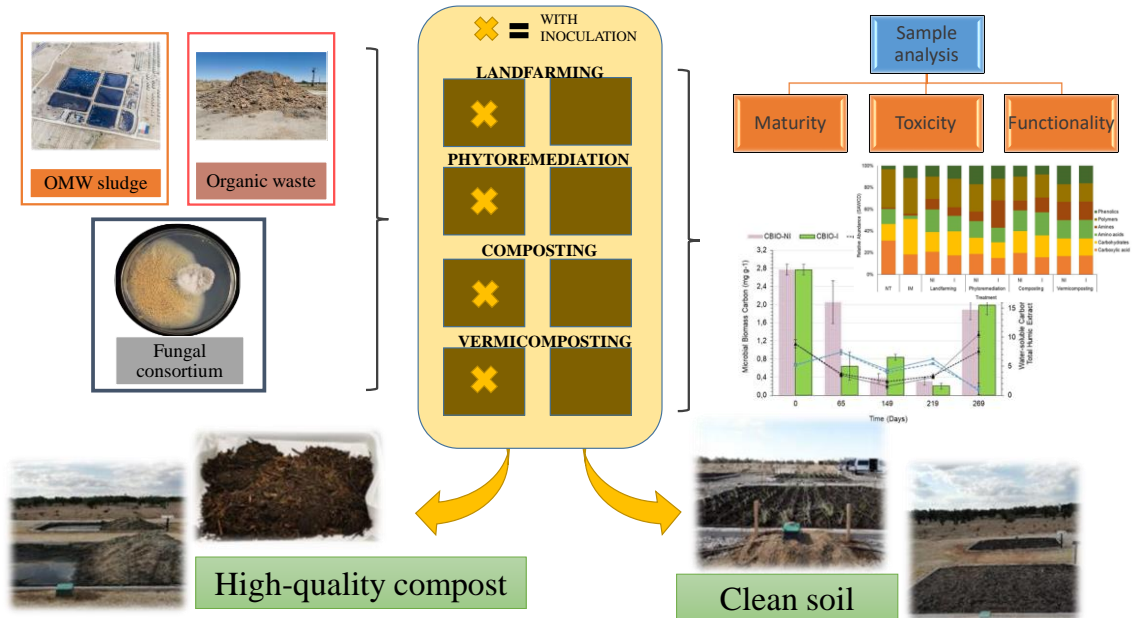
Vico, A., Pérez-Murcia, M.D., Bustamante, M.A., Agulló, E., Marhuenda-Egea, F.C., Sáez, J.A., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moral, R., 2018. Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pruning biomass by co-composting with urban and agri-food sludge. *J. Environ. Man* 226, 408-415.

Zmora-Nahum,S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen, Y. 2005. Dissolved Organic Carnon (DOC) as a Parameter of Compost Maturity. *Soil and Biochemistry* 37 (11), 2109-2116.

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser, J.K.R. (Ed), *Composting of Agricultural and other Waste*. Elsevier, London. UK, pp. 73-86.

Capítulo 4. Estudio comparativo de estrategias de biorremediación de lodos de alpechín

Graphical Abstract



Organic residues and bioaugmentation for the *in situ* biorecovery of olive mill wastewater sludge stored in disposal ponds: comparison of bio-treatments

M.R. Martínez-Gallardo, M.M. Jurado, J.A. López-González, A. Toribio, F. Suárez-Estrella, J.A. Sáez, R. Moral, F.J. Andreu-Rodríguez, M.J. López

Enviado a: Waste Management (2021)

Resumen: El alpechín es un subproducto del proceso de extracción del aceite de oliva que suele eliminarse en balsas de evaporación donde se concentra en forma de lodos y como consecuencia, contamina el entorno de las balsas (suelo y aguas subterráneas). En este estudio se propone añadir residuos orgánicos (compost de setas, estiércol de conejo y gallinaza) e inocular con un consorcio fúngico (*Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16) para convertir los lodos de alpechín en recursos agrícolas como compost, vermicompost o sustrato para el crecimiento de las plantas. Se realizaron actividades de landfarming, fitorremediación, compostaje y vermicompostaje, con y sin inoculación microbiana. La evaluación de los parámetros químicos, la toxicidad y la biodiversidad microbiana funcional reveló que las cuatro estrategias reducían la toxicidad y favorecían la funcionalidad metabólica. El compostaje y el vermicompostaje también ofrecieron productos de alta calidad. La inoculación mejoró la eficacia de la biorremediación. Los tratamientos biológicos son adecuados para la recuperación segura de los lodos de alpechín contaminados y para convertirlos en productos de alta calidad.

Abstract

Olive mill wastewater (OMW), a by-product from the olive oil extraction process, is usually disposed of in evaporation ponds where it concentrates as a sludge that pollutes the surroundings of the ponds (soil and water bodies). In this study, we propose adding organic residues (mushroom compost, rabbit manure, and chicken manure) and inoculating with fungal consortia (*Aspergillus ochraceus* H2 and *Scedosporium apiospermum* H16) to convert the OMW sludge in the pond into resources such as compost, vermicompost, or substrate for plant growth. Landfarming, phytoremediation, composting, and vermicomposting were performed with and without microbial inoculation. Evaluation of chemical parameters, toxicity, and functional microbial biodiversity revealed that the four strategies depleted the toxicity and favored metabolic functionality. Composting and vermicomposting also offered high-quality products. Inoculation improved the bioremediation effectiveness. Biological treatments are suitable for the safe recovery of polluted OMW sludge and turn it into high-quality products.

Keywords: Landfarming, Composting, Vermicomposting, Phytoremediation, Biolog Ecoplate

Highlights

- Organic residues allow recovering olive mill wastewater (OMW) sludge in disposal ponds
- Landfarming and phytoremediation produce clean substrate from OMW sludge
- Composting transforms OMW sludge into good quality compost
- Vermicomposting promotes microbial functional biodiversity in OMW sludge
- Specialised fungal consortium increases the efficiency of biostimulation treatments

1. Introduction

Olive oil is a traditionally essential product in the Mediterranean diet, which is also recognized and marketed worldwide for its nutritional and organoleptic properties. Although olive oil production varies depending on climatic factors, it reached 2,000 million tons per year in the last decade (Lee et al., 2019). This agro-industrial activity generates a large amount of waste that poses a management challenge, being the liquid residue named olive mill wastewater (OMW), one of the principal environmental concerns, because of its polluting effects and large volume (El-Abassi et al., 2012). Around 1.5 m³ of OMW is generated per ton of olives (Pardo et al., 2017; Lee et al., 2019). It consists of 83%–96% water, 3.5%–15% organic constituents, and 0.5%–2% mineral compounds (Lee et al., 2019). Thus, OMW has a high organic load, and includes phenolic compounds responsible for the characteristic blackish color, phytotoxic and antimicrobial effects, and low biodegradability (Mekki et al., 2013).

The most widespread method for managing this waste has been its storage in artificial ponds for natural evaporation during the hot period of the year. This method does not eliminate the problem, but rather moves it, since most ponds are not waterproofed and often overflow polluting the surroundings through the lixiviates (Kavvadias et al., 2017; Martínez-Gallardo et al., 2021). Additionally, OMW is transformed into a more polluting and recalcitrant semi-solid sludge in which toxic compounds are concentrated. Nonetheless, it has been reported that the OMW sludge from evaporation ponds harbors a remarkable microbial community, which can potentially respond to biostimulation (Martínez-Gallardo et al., 2021). That consists of adding nutrients such as organic residues and/or providing oxygen (aeration) to promote the activity of the microorganisms present in the material, allowing its transformation and the elimination of toxic compounds (Martínez-Gallardo et al., 2021). Also, the inoculation with microorganisms (bioaugmentation) having phenol-degrading activity helps to alleviate the toxic load of these residues and biotransform them (Martínez-Gallardo et al., 2020). Landfarming (soil aeration), phytoremediation (plant-mediated), composting, and vermicomposting are strategies that met bioremediation objectives by eliminating toxic compounds. They also biotransform the polluted matrix into a substrate for plant growth or as a product for agricultural applications (Sáez et al., 2020). All these strategies are based on the fundamental role of the microorganisms present in the material, which upon the suitable conditions can eliminate toxic compounds and stabilize the

organic matter thanks to their wide range of metabolic activities (Ntougias et al., 2013). Microbial communities quickly adapt to changes that may occur in the environment, modifying the physiological and microbial profile of the treated waste (Feigl et al., 2017). Because each mentioned bio-treatment involves different conditions at diverse levels, the study of the functional diversity of the microbial community will offer information on the performance of each technique for the decontamination and safe recovery of OMW sludges.

In this work, we evaluate the effectiveness of four bio-treatments (composting, vermicomposting, phytoremediation, and landfarming) for the biorecovery of OMW sludge. All the bio-treatments were conducted on the evaporation pond where OMW sludges were stored. Organic residues were supplemented in all the cases as biostimulating agents and the effect of inoculation with phenol-degrading microorganisms was assessed.

2. Material and methods

2.1. Study area and start-up

The study was carried out in an OMW evaporation pond located in Mora municipality (Toledo, Spain) (39°40' 07.4" N 3°49' 40.2" W) that has a total surface of 2,400 m². The partially dried OMW sludge contained in the pond was extracted and mixed with spent-mushroom compost (SM), rabbit manure (RM) and chicken manure (CM) at the following w/w ratios 0.5:0.12:0.33:0.05 (OMW : SM : RM : CM) that give a final C/N ratio of 25 in the mixture. This material was incorporated into eight plots of 7.5 m x 7.5 m x 0.2 m built up in the pond, where four bio-treatments were applied: landfarming, phytoremediation, composting and vermicomposting (Supplementary material Fig. S1). Two plots were allocated for the development of each bio-treatment with the intention of studying the effect of bioaugmentation. At the beginning of the experiment, one out of every two plots was inoculated with biomass of a microbial consortium constituted by the phenol-degrading fungi *Aspergillus ochraceus* H2 and *Scedosporium apiospermum* H16, both isolated from OMW sludge in a previous study (Martínez-Gallardo et al., 2020). The fungal biomass was distributed homogeneously on the surface of the plots for landfarming and phytoremediation, and layer-by-layer of the initial mixture, every 50 cm during the construction of composting and vermicomposting piles as described below.

2.2. Development of bio-treatments and sampling

For the development of the landfarming bio-treatment, two plots were filled with the previously described initial mix. This material was subjected to biweekly aeration during the first 4 months and monthly for the following 5 months by tilling with a rototiller. Daily sprinkler irrigation was applied by drippers (2 L / min) in both plots, resulting in a flow rate of 140 L / week.

Composting and vermicomposting bio-treatments were carried out in four plots where trapezoidal piles of 7.5 m x 3.75 m x 1.5 m were built using the initial mix. First, a composting process was carried out using both bio-treatments, that is, with or without microbial inoculum. From composted material up to a stage corresponding to the end of the bio-oxidative phase, the piles destined for vermicomposting were placed in a trapezoidal trench of 7 x 1.3 x 0.4 m. They were moistened to 80% and added with 6,300 earthworms of the species *Eisenia foetida* and *Eisenia andrei*. For their part, the composted piles were considered finished after passing the cooling and maturing phase. Water was regularly incorporated to maintain the humidity around 50-60% and during the bio-oxidative phase, the piles were periodically turned over according to the thermal log.

The plant species selected for phytoremediation bio-treatment were *Juncus acutus*, *Chrysopogon zizanioides*, *Claudium mariscus* and *Phragmites australis*. They were planted in two plots that were divided into three frames of 2.5 m x 7.5 m. Each species was placed in its corresponding frame (sub-plot) with a density of 3.5 individuals / m². The irrigation system was the same as described above for landfarming.

The samplings were carried out at the beginning and every two months for a total period of 269 days. Composite samples from five equidistant points were taken in each plot destined for landfarming, composting and vermicomposting. In the case of phytoremediation, three composite samples were obtained from each sub-plot based on 5 points located in each frame of plant species included in the trial. In order to characterize the initial state of the material and, therefore, to set initial values that allow to study the efficacy of the bioremediation bio-treatments, a composite sample from the partially dried OMW sludge contained in the pond was collected before the aforementioned extraction and mixture. All samples were used for the analytical described below except OMW

sludge samples, in which just phytotoxicity, ecotoxicity and functional biodiversity were analyzed.

2.3. Analytical

The total content of organic matter (OM) was determined by weight loss on ignition at 550 °C for 3.5 h. The pH and electrical conductivity were analyzed in a 1:10 (w/v) water extract.

Microbial biomass carbon (CBIO) was tested using the fumigation-extraction technique according to Vance et al. (1987). The fumigated and non-fumigated extracts were analyzed using a TOC-VCSN (Shimadzu Co., Japan). CBIO was calculated by subtracting the total organic carbon (TOC) of the non-fumigated samples from the fumigated ones.

The Water soluble carbon (WSC) was obtained following the protocol described by Goyal et al. (2005), and the organic carbon was analyzed in the aqueous extract using a TOC-VCSN (Shimadzu Co., Japan).

Humic acid (HA) and fulvic acid (FA) fractions were extracted as described by Ciavatta et al. (1991). TOC was measured in the extracts using an automatic analyzer for liquid samples (TOC-V CSN Analyser, Shimadzu Japan).

Functional biodiversity was determined by analyzing the physiological profile at the community level using Biolog® EcoPlate™ (Biolog, USA) microplates. These plates consist of 96 wells with three sets of 31 carbon sources. The analysis was performed according to the protocol described by Martínez-Gallardo et al. (2021). The functional biodiversity was expressed as Shannon index ($H' = -\sum p_i \ln p_i$) and average well color development (AWCD) = $\sum ODi / N$; where OD_i = proportional color development of each, $p_i = ODi$ over the total color development of all wells of a plate and N = number of total substrates (31). The average well color development values of each substrate category were calculated, SAWCD = $\sum ODi / N$, in this case OD_i is the OD value of the substrates within each category of substrate and N is the number of substrates in each category.

The phytotoxicity analysis was carried out by evaluating the germination of *Lepidium sativum* seeds, according to Zucconi et al. (1985) slightly modified by Martínez-Gallardo et al. (2020).

To determine ecotoxicity, the *Aliivibrio fischeri* bioluminescence inhibition Aboatox kit (kit 1243-500 BioTox; Aboatox, Finland) was used, according to Jarque et al. (2016). Luminescence was measured in Luminoskan Ascent luminometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The concentration of sample causing a 50% reduction of the light emitted by the *A. fischeri* (EC50) was calculated using regression equations. Toxicity units (TU) were calculated as follows: $TU = [1 / (EC50)] \times 100$.

2.4. Data analysis

Analytical were performed at least in triplicate and data are presented as the mean. A one-way analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests of Fisher's least significant difference (LSD) at a 95% confidence level were used to test for significant differences between factor levels. Normality and homogeneity of the variances were checked using the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. Analyses were carried out using Statgraphics Centurion XVII version 17.1.1.

3. Results and discussion

3.1. Evolution of chemical fractions and biomass carbon

In this work, four bio-treatments were compared in order to evaluate the most efficient and sustainable treatment to manage OMW sludge in evaporation ponds. These polluting residues, together with other residual organic materials of agricultural and livestock origin, are intended to be exploited to obtain added-value products and services. The four bio-treatments are expected to promote the natural break down of organic matter into inorganic substances and stable organic matter by means of the activity of microorganisms (Prakash et al., 2015). This was measured by analyzing the evolution of the water-soluble carbon released, the organic matter stabilized as humic compounds, and the microbial biomass carbon and metabolic biodiversity during time for the four bio-treatments (Figure 1). The analysis of the initial mixture revealed a high content of

microbial biomass carbon (CBIO) ($2.77 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1}$) because of the microbial load supplied by the organic residues (Pardo et al., 2017). However, the water-soluble carbon (WSC) content was very low ($5.22 \pm 0.22 \text{ mg g}^{-1}$) likely due to the consumption of easily biodegradable substances of OMW sludge during the long-term storage in evaporation ponds (Kavvadias et al., 2010). Landfarming led to a gradual CBIO decrease during time up to final values around 1 mg g^{-1} . This phenomenon could be explained by the release of water-soluble phenols resulting from organic waste matter degradation as Abid and Sayadi (2006) previously reported. They also described an increase in WSC release in the first stage of OMW composting, which is faster compared to that obtained for the landfarming bio-treatment applied in this work, which is a longer process in which organic matter is slowly decomposed (Koul and Taak, 2018). The total humic (TH) content was higher in the initial mixture than at the final of the landfarming process reaching values of 1.92 and $1.97 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, in the inoculated and non-inoculated plots, respectively. This phenomenon is explained by the slight structural similarity between the humic substances and polyphenolic compounds can lead to incorrect detection of phenolic molecular complexes instead of TH content. Additionally, the low final values of TH resulting from landfarming were expectable since despite the fact that this process allows the decontamination of the soil as well as obtaining a clean soil rich in organic matter, a more intensive degradative activity is necessary to reach a mature and stable product such as compost. The inoculum did not affect the parameters studied in landfarming.

In the case of the composting, the CBIO decreased during the bio-oxidative phase because of the antimicrobial character of phenols releasing as previously mentioned (Fig. 1b). On the other hand, the different complex structures of substrates present in raw material could affect the diversity of microbial communities and, therefore the microbial biomass (Mondini et al., 2006; Feigl et al., 2017). At the end of the process, an increase of CBIO (final values of 1.99 and 1.88 mg g^{-1} in inoculated and non-inoculated pile, respectively) was observed likely due to the C source available that is released from complex structure or recalcitrant compounds finally broken down. The WSC content slightly increased for the first 65 days as a result of starting residual organic matter biodegradation and easily consumable substances by microorganisms. The trends of WSC was different to landfarming, since in this bio-treatment the high temperatures reached during bio-oxidative phase favor the compounds hydrolysis in monomers and its

utilization by microbial communities. At 219 day, the WSC values increased again in parallel with the previously described CBIO. Bustamante et al. (2008) showed similar results in a study of co-composting of distillery wastes with animal manures. In that work, this behavior was justified by the presence of diverse stable and labile organic compounds with different breaking down rates. The final values of WSC were 0.76 and 1.10 mg g⁻¹ in the inoculated and non-inoculated piles, respectively. Those values are well below 4 mg g⁻¹ which is the threshold established to consider a mature and stable compost (Zmora-Nahum et al., 2005). The humic substances trend was negatively related to WSC, as it was expected due to the degradation and humification of organic matter (Mondini et al., 2006). In this parameter was noticeable the effect of bioaugmentation since the fungal consortium seems to improve the humification process due to its high capacity to phenolic compounds degradation and the subsequent monomers incorporation to humic complex (Barje et al., 2010).

The vermicomposting is very similar to composting in the maturity parameters trends studied, such as CBIO, WSC and TH (Fig 1c). However, it was remarkable that the values of WSC and TH content were higher at the end of the process than those obtained in the other bio-treatments tested. This phenomenon is explainable by the positive effect of earthworm on improving the residual organic matter degradation as well as the more recalcitrant compounds that could remain in the pre-composted material (Rékási et al., 2019). On the other hand, the CBIO content at the end of the vermicomposting process was not as high as in composting, reaching values of 0.84 and 1.49 mg g⁻¹ in the inoculated and non-inoculated piles, respectively. It has been reported that the digestion of the organic matter by earthworms can provoke a negative consequence on microbial biomass by depletion of the available resources (Domínguez and Edwards, 2010).

The results obtained from phytoremediation bio-treatment about WSC content showed a similar trend than landfarming, since this process is also slower than composting and vermicomposting (Fig 1d). In this case, TH content was remarkably higher at the end of the bio-treatment despite the material was not totally stabilized since the nutrient availability remained very high such as shown in the WSC content. The known high potential of plants in order to phytodegrade recalcitrant organic substances (Cunningham et al., 1996) resulting in the release of water-soluble phenols. Some studies support that the presence of phenolic compounds triggers the production of specific

enzymes by plants, such as peroxidases, which are involved in the metabolism and elimination of these substances (Pletsch et al., 1999). This explains the high increase in humic substances, which results, as before mentioned, from an incorrect detection of phenolic substances in their place.

The overall results showed that composting and vermicomposting bio-treatments successfully decontaminated the OMW sludge from evaporation ponds, as well as transforming it together with the organic waste from nearby sources into a mature and stable product. As previously aforementioned, OMW sludge is a waste sediment that possesses a high amount of substances highly resistant to degradation such as phenolic and lingo-cellulosic compounds whose presence provokes antimicrobial effects. This assumption supports the success of composting and vermicomposting as bioremediation bio-treatments because the high temperatures reached during the process accelerate the biodegradation by microorganisms. The landfarming technique was not as efficient in bioremediation and stabilization of the material because the performance of the microorganisms was slower due to the process conditions. On the other hand, phytoremediation is an adequate bio-treatment to eliminate pollutants in soils being more effective when plants are established in a fertile substrate. It favors biostimulation of rhizosphere microbiota and the phytostabilization by its capability of incorporating pollutants in humic substances and reducing its bioavailability (Cunningham et al., 1996). According to the results, the combination of several bioremediation techniques such as composting or vermicomposting followed by phytoremediation could be the most suitable and sustainable solution in OMW contaminated soil, recovering and recycling it into a high quality amendment.

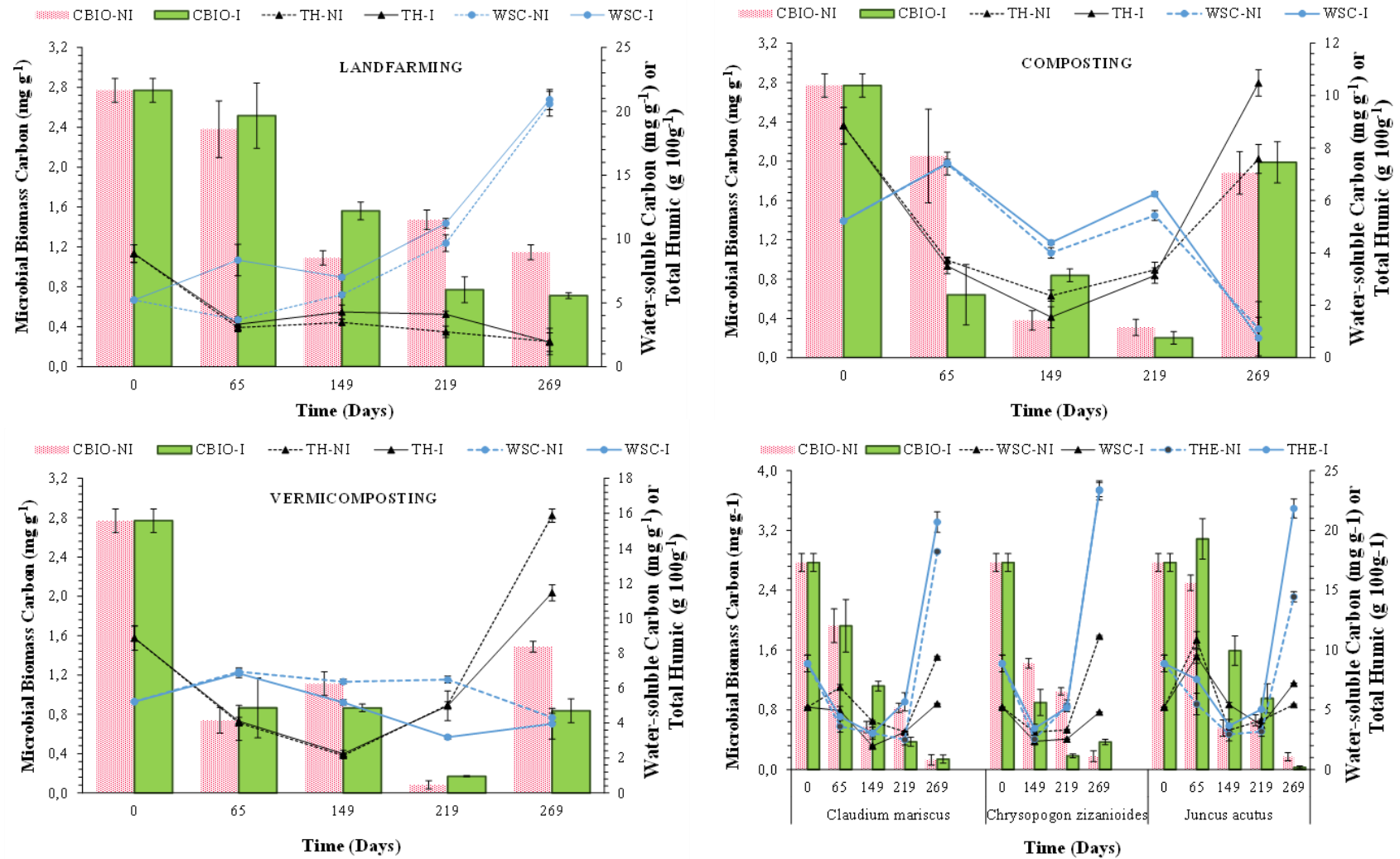


Figure 1. Evolution of microbial biomass carbon (CBIO) (principal axis), total humic and water-soluble carbon fractions (secondary axis) in the non-inoculated (NI) and inoculated (I) landfarming (a), phytoremediation (b), composting (c) and vermicomposting (d). Results are the mean of three replicates. Errors bars represent the LSD Fisher interval (p<0.05).

3.2. Study and functionality of microbial community in each bio-treatment

The metabolic analysis of microbial communities reflects the interactions between the microorganisms and the environment. In this study, this assay was performed using the Biolog Ecoplate technique that is a culture-dependent approach, which reveals the most active populations within the microbial community and thus, the community's physiological patterns (Feigl et al., 2017). The general potential metabolic activity of the microbial community (average well color development, AWCD) present in the non-treated material contained in the OMW evaporation pond, the initial mixture and the final materials from each bio-treatment, in addition to its physiological diversity (Shannon Index, H) are shown in Fig 2a. The AWCD and H, as functional biodiversity indexes, analyzed from the non-treated material were the lowest values (0.368 and 2.643, respectively) despite the high microbial diversity studied in long-term stored OMW by other authors such as Hernández et al. (2018). This low microbial activity and its diversity are mainly due to the toxic effect derived from the high level of phenolic compounds which alter the microbial community (Ntougias et al., 2013), as well as the OMW sludge recalcitrance and its resistance to biodegradation (Vivas et al., 2009). The addition of the organic materials to the non-treated material significantly increased the microbial metabolic activity reaching an AWCD value of 0.847, as it was previously shown with the evaluation of microbial biomass carbon. This potential metabolic increase is very evident as nutrients incorporation stimulates indigenous microbiota activity and growth, in addition, the microbial consortium that specifically degrades polyphenol was later inoculated. This microbiota is capable of detoxifying OMW, allowing greater colonization and transformation of residual organic matter by microorganisms that were previously unable to inhabit there (Ntougias et al., 2013). The functional diversity also augmented after obtaining initial mixture until the AWCD value of 3.060. This increase of the microbial metabolism was a result of the biostimulation caused by the nutrient supply. In comparison to the initial metabolic status of the material (OMW sludge), all bio-treatments favored the increase of metabolic activity in the microbial community. Similar results showed previously by other authors, such as Pardo et al. (2014), who demonstrated that organic matter incorporation to the soil resulted in functional diversity increase. The bio-treatments of landfarming, phytoremediation and composting showed similar results to the IM about functional diversity expressed as Shannon Index H, obtaining a range of values between 2.978 and 3.099, being the results for

vermicomposting significantly higher. However, the results concerning the activity abundance, expressed as AWCD, in most cases was significantly higher than the IM, with the exception of phytoremediation and composting without bioaugmentation, whose results were similar to IM. The results of AWCD from vermicomposting bio-treatment were also significantly higher, showing values of 1.336 and 1.339, in the piles without consortium and inoculated, respectively. The microbial consortium significantly improved the diversity and abundance in most of the treatments. These results are according to other research such as Vivas et al. (2009) where it was proved that vermicomposting is an effective bio-treatment to activate functional microbial abundance and diversity of a pollutant residue such as OMW. They also affirmed that *E. fetida* probably favors the metabolization of more recalcitrant substances and, consequently, the release of smaller molecules easier to use by microorganisms and, thus, the enhancement of microbial activity. Other authors have reported an increase of the microbial functionality directly proportional to the earthworm biomass growth in vermicomposting treatments (García-Sánchez et al., 2017).

The microbial community in soils is commonly regulated by the organic matter content, which is considered as a key factor (Martínez-Gallardo et al., 2021). Therefore, the functional aspects related to the utilisation of organic carbon can provide relevant information on the effect of the different biological treatments applied in this work for the recovery and reuse of OMW sludge. The relative abundance of the metabolic activities (SAWCD) grouped according to the chemical family of the substrates analyzed in samples from non-treated material, initial mixture and the final material of inoculated and non-inoculated bio-treatments is shown in Figure 2b. The pattern of relative abundance of functionalities in the non-treated material was dominated by the metabolic activities related to the utilization of polymers (35.3%) and carboxylic acid (31.3%) followed by carbohydrates and amino acids, both with average values of 14%, and amines and phenolic compounds which were the less represented with an average relative abundance of 2%. These results are according to those obtained by Martínez-Gallardo et al. (2021) where, among other physic-chemical and biological parameters, the functional biodiversity present in several OMW evaporation ponds in disuse was studied. The predominance of these chemical groups of substrates, such as polymers and carboxylic acid, provides information about the most of carbon availability in the non-treated material from OMW sludge stored in evaporation ponds that is contained in recalcitrant

compounds. The indigenous microbial community of OMW sludge is perfectly suitable for starting to metabolize this sort of substance as previously other authors have postulated (Martínez-Gallardo et al., 2020; Ntougias et al., 2013). However, this autochthonous microbiota has to be stimulated with organic matter that provides carbon sources easily degradable such as carbohydrates. The effect of biostimulation can be explained by the SAWCD pattern shown by the initial mixture, where the relative abundance of carbohydrates increased by about twice the value found in the untreated material (33%). Other noticeable change in the pattern of relative abundance was the increase of phenolic compounds utilization (11%), which is in concordance with Federici et al. (2011) who demonstrated that bacterial community naturally present in two-phase olive mill waste can be favored to accelerate its growth and metabolic development by a biostimulating process. They concluded that these bacterial communities are specialized in organic matter decomposition, specifically phenolic compounds. Thus, these results suggest that OMW sludge from evaporation ponds are naturally enriched in microorganisms potentially capable of degrading phenolic compounds. Nevertheless, they must be stimulated to optimize their biodegradable potential (Martínez-Gallardo et al., 2020). The functional analysis of the final product obtained from each bio-treatment revealed a very similar metabolic profile showing the following values ranges of substrates utilization: 14-22 % in carbohydrates, 20-26 % in polymers, 13-22 % in amino acids, 11-21 % in carboxylic acids, 8-17 % in phenolic compounds and 8-17 % in amines with the exception of the final material from inoculated phytoremediation bio-treatment where this value reached a 25 %. This increase in activity related to the use of compounds with amino groups compared to the rest could be justified by the effect of the fungal inoculum that enhances the role of rhizosphere microorganisms in the use of nitrogen-containing substrates. (Liu et al., 2020). In addition, it is highly remarkable such a well-balanced pattern analyzed in the final vermicompost, where the utilization of each tested substrate supposes around 16.5 %. These results have shown that the bio-treatments applied are optimal processes to stimulate the microbial community present in the OMW matrices to biodegrade the organic matter and, standing out above all vermicomposting bio-treatment since finally produce the most stable and functionally balanced product (Ntougias., 2013; Federici., 2011; Vivas et al., 2009). Some authors affirm that the joint action of the autochthonous microbiota from the composting pile and that present in the intestine of the earthworms under controlled conditions favors the accelerated bio-

oxidation of organic matter which characterizes the final product obtained (Vivas et al., 2009).

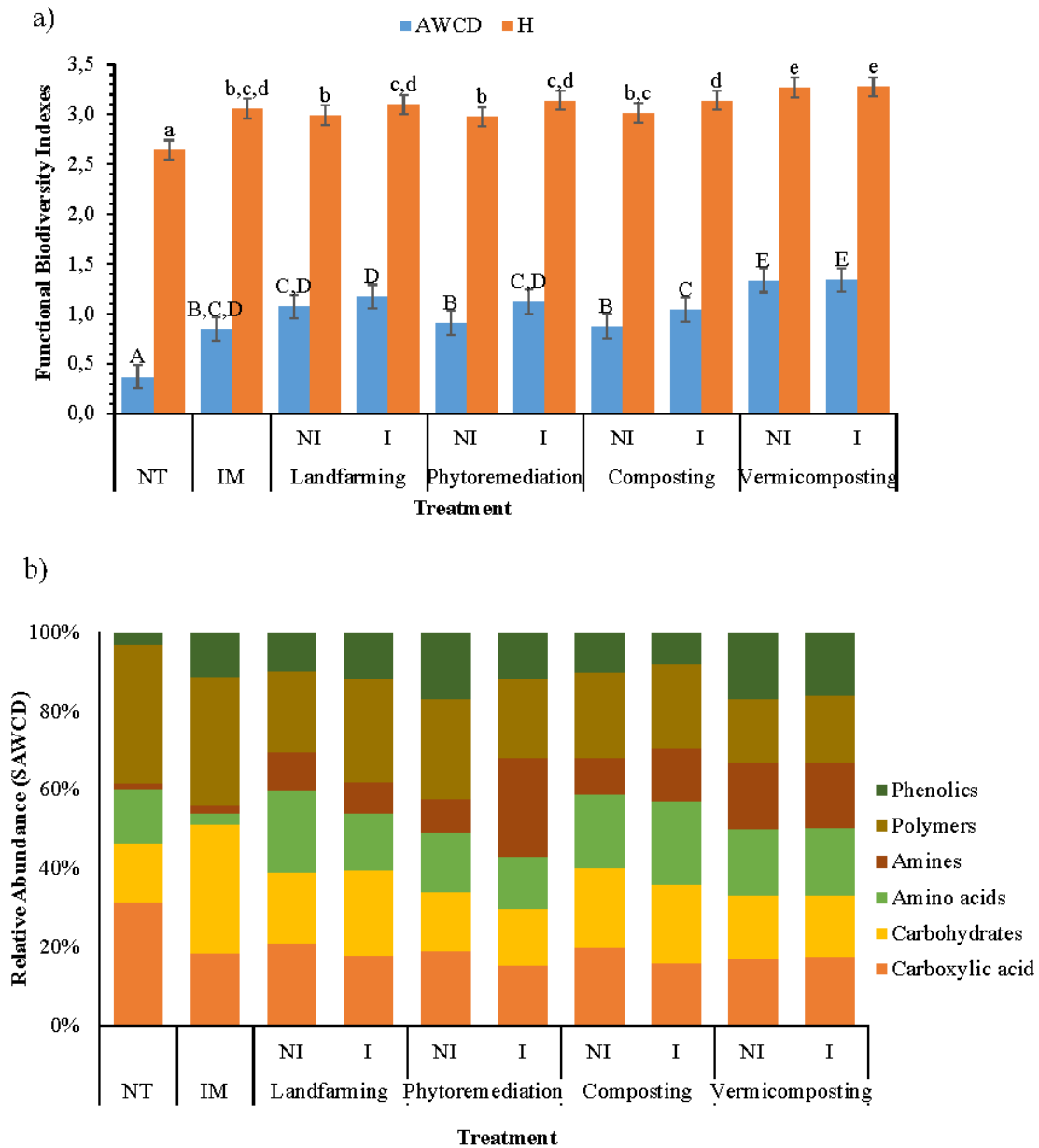


Figure 2. Mean values of functional biodiversity indexes (a), such as Shannon Index (H') and average well color development (AWCD), and metabolic profile (b) in the non-treated material (NT), the initial mixture (IM) and the final inoculated (I) or non-inoculated (NI) material from landfarming, phytoremediation, composting, and vermicomposting treatments, expressed as a percentage of utilization of each group of substrates. The values are the average of three replicates. Error bars represent LSD interval, the bars bearing different letters were significantly different according to Fisher's LSD test ($p < 0.05$) (lower case letters for AWCD and uppercase letters for H').

3.3. Characterization of final material after biological treatments

To reflect the effectiveness of each bio-treatment here applied for the biorecovering of OMW sludge stored in evaporation ponds, the values according to toxicity (phytotoxicity and ecotoxicity) from non-treated material, initial mixture and final materials were tested and shown in Table 1. Phytotoxicity was expressed as Germination Index (GI) indicating high phytotoxicity when values are below 50%, moderate phytotoxicity when values are between 50-80 %, absence of phytotoxicity when GI is above 80%, and phytostimulant effect when values above 100% (Zucconi et al., 1985; Emino and Warman, 2004). The ecotoxicity values were expressed as toxicity units (TUs). Persoone et al. (2003) established the following levels of ecotoxicity: very high acute toxicity when the values are higher than 100 TUs; high acute toxicity when the values are higher than 10 TUs but lower than 100 TUs; acute toxicity when the values are higher than 1 TU but lower than 10 TUs; slight acute toxicity when values are higher than 0.4 Tus but lower than 1 TU; and no acute toxicity when values are lower than 0.4 TUs. As other authors have previously described, OMW sludge is composed of a high load of organic substances such as phenolic compounds that provokes high ecotoxicity and presents a potent antibacterial effect (Hentati et al., 2016; Babić et al., 2019). Thereby, non-treated OMW sludge showed high acute toxicity (26.50 TUs) and moderate phytotoxicity (70.77 % GI). These results are in concordance with other studies such as Martínez-Gallardo et al. (2021) where the toxicity of OMW sludges from seven evaporation ponds was analysed. The value of phytotoxicity in most sludges was around 50-80 % GI, and in the case of ecotoxicity they reached values above 10 TUs. However, when organic matter was added to the OMW sludge, there was a reduction of ecotoxicity (5.38 TUs). This phenomenon might be explained by the dilution of recalcitrant compounds which, as previously mentioned, cause ecotoxicity. On the other hand, phytotoxicity increased with the incorporation of organic waste matter (49.27% IG) likely due to the presence of phytopathogenic microorganisms in the raw materials, which supports the need to apply a biological treatment to detoxify the residual organic matter (Hachicha et al., 2009). All biological treatments favoured the reduction of toxicity by transforming OMW sludge together with agricultural and livestock waste organic matter into a material with ecotoxicity and phytotoxicity values below 1 TU and above 80 % GI, respectively, which is considered mild or no toxicity. Values of TUs below 0.4 meaning absence of ecotoxicity were tested in final material from phytoremediation and

vermicomposting, the latter being the best bio-treatment in eliminating ecotoxicity. Nevertheless, the higher GI values were found in the final material from composting, exceeding 100 % GI in this case (117.88 and 129.24 % GI in the non-inoculated and inoculated piles, respectively), which means the material presents phytostimulant properties. It is highly remarkable that phytoremediation bio-treatment achieves the ecotoxicity disappearance but the final material obtained was moderately phytotoxic. Some authors have demonstrated the capacity of certain plant species to eliminate polluting compounds present in the soil through various mechanisms, including the assimilation of toxic compounds in their structures through a process of phytoextraction, as well as the development of rivalry mechanisms against surrounding plants through the release of phytotoxic molecules (Cunningham et al., 1996). In this way, it is easily explainable by the low values of GI present in these final materials. Vermicomposting was presented as an efficient bio-treatment to reduce the toxicity of OMW sludge and supported the results mentioned above, based on the ability of earthworms to stimulate the functional biodiversity of OMW sludge, which favours the depletion of potential toxic compounds, such as phenolic compounds. However, composting bio-treatment ensures the final compost has phytostimulant capacity, which makes it an organic amendment of agronomic interest (Martínez-Gallardo et al., 2020; Sáez et al., 2020). On the other hand, inoculation has no effect on the reduction of ecotoxicity, but it does have an effect on the effectiveness of landfarming and composting biotreatments in reducing phytotoxicity and even, in the latter case, in improving the phytostimulant effect.

According to the previously discussed results about maturity and toxicity, as well as functional study, the final material from composting and vermicomposting are adequate and suitable substrate for agricultural purposes. Moreover, the physicochemical parameters related to the quality of inoculated and non-inoculated compost and vermicompost are shown in Table 2, and they are contrasted with those reported in the literature as optimal or with threshold limits from legislation.

Table 1. Phytotoxicity (Germination Index, %GI) and ecotoxicity (Toxicity Units, TUs) values in OMW sediments, initial mixture and final material from inoculated and non-inoculated bioremediation treatments. Values are the mean of three replicates.

Treatment	Phytotoxicity (GI, %)	Ecotoxicity (TUs)
OMW sludge	71 c,d	26.50 a
Initial Mixture	49 a	5.38 b
Landfarming Non-Inoculated	85 e	0.52 e
Landfarming Inoculated	94 f	0.54 e
PhytR ^a <i>Juncus Acutus</i> Non-Inoculated	56 b	0.14 i
PhytR <i>Juncus Acutus</i> Inoculated	58 b	0.29 g,h
PhytR <i>Claudium Mariscus</i> Non-Inoculated	53 a,b	0.14 i
PhytR <i>Claudium Mariscus</i> Inoculated	56 b	0.25 h
PhytR <i>Chrysopogon Zizanoides</i> Non-Inoculated	74 d	0.36 f,g
PhytR <i>Chrysopogon Zizanoides</i> Inoculated	66 c	0.37 f
Composting Non-Inoculated	118 h	0.82 d
Composting Inoculated	129 i	0.96 c
Vermicomposting Non-Inoculated	100 g	0.14 i
Vermicomposting Inoculated	101 g	0.13 i

^aPhytR: Phytoremediation

In general, all the final materials obtained from composting and vermicomposting with and without bioaugmentation were within the optimal range of each parameter necessary to consider the material as suitable for agricultural use. However, some exceptions were contemplated such a C/N ratio of 23 tested in the inoculated vermicompost, exceeding the optimal range of values. In that respect, it should be taken into account that OMW sludge is a difficult raw material to homogenize due to the hardness and the stone-shaped structure that form in the evaporation ponds (Martínez-Gallardo et al., 2021). This aspect of the raw material can influence its efficient degradation and stabilization of the final material and, consequently its C/N ratio (Sáez et al., 2021; Abid et al., 2006). For this reason, the results concerning OM content in the non-inoculated compost are also understandable. The non-inoculated compost was the only material that surpassed the optimal range established by literature to pH, showing a value of 8.6. The lower values tested in final inoculated compost and vermicompost with 7.5 and 8.0 respectively, showing the effect of the inoculum on nitrification reactions enabling nitrogen availability in the soil to plants (Abid et al., 2006; Cunningham et al., 1996).

Table 2. Physicochemical characteristics of the final material from composting and vermicomposting.

Parameters*	Optimal values**	Compost		Vermicompost	
		Inoculated	Non-Inoculated	Inoculated	Non-Inoculated
OM (%)	>20 ^b	21	18	24	20
C/N	<15-20 ^b	13	12	23	15
pH	6.5-8.5 ^b	8.0	8.6	7.5	8.2
EC (dS/m)	<4 ^c	3.7	2.8	0.7	0.8
C _{HA} /C _{FA} ratio	>1 ^b	2.3	2.0	2.2	2.1
Fe (g/kg)	***	13.8	12.2	14.2	12.1
Cd (ppm)	***	0.10	0.11	0.13	0.13
Cu (ppm)	***	27	33	29	38
Ní (ppm)	***	21.7	31.4	18.4	24.1
Pb (ppm)	***	11.0	20.3	10.0	21.0
Zn (ppm)	***	104	103	119	122
Cr (ppm)	***	77	78	68	61

*Abbreviations: OM: organic matter; EC: electrical conductivity; C/N: carbon-nitrogen ratio; C_{HA}/C_{FA}: humification ratio.

**The optimal values have been reported in the following literature: (a) Bernal et al., 2009; (b) Bernal et al., 2017; (c) Jara-Samaniego et al., 2017.

***Compost and vermicompost heavy metal contents are within optimal range according to BOE (2017).

4. Conclusion

Supplementation of OMW sludges with organic residues combined with bioaugmentation by a specialised fungal consortium increases the efficiency of biotreatments for the revalorisation of the waste into products of commercial interest in the framework of the circular economy. Landfarming and phytoremediation favour the decontamination of OMW sludge, resulting in clean soil. Composting and vermicomposting also offer ideal conditions for transforming sludge into a stable material suitable for agricultural purposes. The addition of earthworms to the composting process

enhances the stimulation of functional biodiversity by achieving a well-balanced metabolic profile of the microbial community present in the final compost.

5. Appendix A. Supplementary Material

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

The following are the Supplementary data to this article:

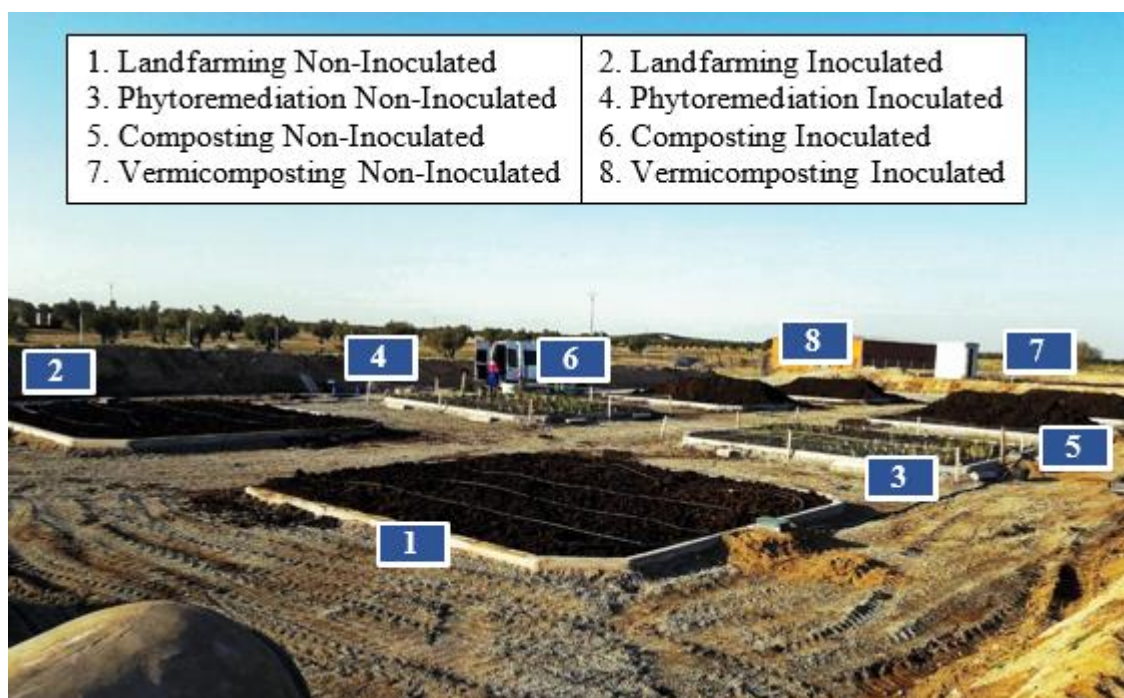


Figure S1. Biological treatments carried out in 8 plots built in an evaporation pond after the removal of OMW sludges contained there. Bio-treatment are indicated with a number (1-8).

Acknowledgment

This work was supported by the project LIFE+REGROW [LIFE16 ENV/ES/000331] “Reclamation of olive oil waste abandoned lagoons using bio-recovering strategies in a circular economy”. Authors are grateful to Mora municipality (Toledo, Spain) and to GESREMAN Company for their help during the field trials in OMW evaporation ponds.

6. References

Abid, N., Sayadi, S., 2006. Detrimental effects of olive mill wastewater on the composting process of agricultural wastes. *Waste Manage.* 26(10), 1099-1107. doi.org/10.1016/j.wasman.2005.06.015.

Babić, S., Malev, O., Pflieger, M., Lebedev, A.T., Mazur, D.M., Kužić, A., Trebšec, P., 2019. Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays. *Sci. Total Environ.* 686, 903–914. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.046.

Barje, F., El Fels, L., El Hajjouji, H., Amir, S., Winterton, P., Hafidi, M., 2012. Molecular behaviour of humic acid-like substances during co-composting of olive mill waste and the organic part of municipal solid waste. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 74: 17-23. doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.004.

Bernal, M.P., Alburquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100(22), 5444-5453. doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027.

Bernal, M.P., Sommer, S.G., Chadwick, D., Chen, Q., Li Jr., G., Michel, F.C., 2017. Chapter Three - Current approaches and future trends in compost quality criteria for agronomic, environmental and human health benefits. *Adv. Agron.* 144, 143–233. doi.org/10.1016/bs.agron.2017.03.002.

Bustamante, M. A., Paredes, C., Marhuenda-Egea, F. C., Pérez-Espinosa, A., Bernal, M. P., Moral, R., 2008. Co-composting of distillery wastes with animal manures: Carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. *Chemosphere*, 72(4), 551-557. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.030.

Ciavatta, C., Govi, M., Vittori Antisari, L., Sequi, P., 1991. Determination of organic carbon in aqueous extracts of soils and fertilizers. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22(9-10), 795-807. doi.org/10.1080/00103629109368455.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56(1), 55-114.

Domínguez, J., Edwards, C.A., 2010. Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting, in: Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Sherman, R. (Eds.), *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 25–37.

El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., 2012. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chem.* 132(1), 406-412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.013>.

Emino, E.R., Warman, P.R., 2004. Biological assay for compost quality. *Compost. Sci. Util.* 12 (4), 342–348. doi.org/10.1080/1065657X.2004.10702203.

Federici, E., Pepi, M., Esposito, A., Scargetta, S., Fidati, L., Gasperini, S., Cenci, G., Altieri, R., 2011. Two-phase olive mill waste composting: community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresour. Technol.* 102(23), 10965-10972. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.062.

Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E., Molnár, M., 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Sci. Total Environ.* 595, 903-911. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.266.

García-Sánchez, M., Taušnerová, H., Hanč, A., Tlustoš, P., 2017. Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: Changes in chemical and biological parameters. *Waste Manage.* 62, 33-42. doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.008.

Goyal, S., Dhull, S. K., Kapoor, K. K., 2005. Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresour. Technol.* 96(14), 1584-1591. doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.012.

Hachicha, S., Cegarra, J., Sellami, F., Hachicha, R., Drira, N., Medhioub, K., Ammar, E., 2009. Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its cocomposting with sesame bark. *J. Hazard. Mater.* 161 (2–3), 1131–1139. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.066.

Hentati, O., Oliveira, V., Sena, C., Bouji, M.S.M., Wali, A., Ksibi, M., 2016. Soil contamination with olive mill wastes negatively affects microbial communities, invertebrates and plants. *Ecotoxicology* 25, 1500–1513. doi.org/10.1007/s10646-016-1700-4.

Hernández, D., Astudillo, C.A., Fernández-Palacios, E., Cataldo, F., Tenreiro, C., Gabriel, D., 2018. Evolution of physical-chemical parameters, microbial diversity and VOC emissions of olive oil mill waste exposed to ambient conditions in open reservoirs. *Waste Manage.* 79, 501-509. doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.022.

Jara-Samaniego, J., Pérez-Murcia, M.D., Bustamante, M.A., Pérez-Espinosa, A., Paredes, C., López, M., López-Lluch, D.B., Gavilanes-Terán, I., Moral, R., 2017.

Composting as sustainable strategy for municipal solid waste management in the Chimborazo Region, Ecuador: Suitability of the obtained composts for seedling production. *J. Clean. Prod.* 141, 1349-1358. doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.09.178.

Jarque, S., Masner, P., Klánová, J., Prokeš, R., Bláha, L., 2016. Bioluminescent *Vibrio fischeri* assays in the assessment of seasonal and spatial patterns in toxicity of contaminated river sludges. *Front. Microbiol.* 7, 1738. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.266.

Kavvadias, V., Elaiopoulos, K., Theocharopoulos, S., Soupios, P., 2017. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. *B. Environ. Contam. Tox.* 98, 323-330. doi.org/10.1007/s00128-016-1922-4.

Koul, B., Taak, P., 2018. Ex situ soil remediation strategies. In: *Biotechnological Strategies for Effective Remediation of Polluted Soil*. Springer, Singapore, pp. 39-57. doi.org/10.1007/978-981-13-2420-8_2.

Lee, Z.S., Chin, S.Y., Lim, J.W., Witoon, T., Cheng, C.K., 2019. Treatment technologies of palm oil mill effluent (POME) and olive mill wastewater (OMW): A brief review. *Environ. Technol. Inno.* 15, 100377. doi.org/10.1016/j.eti.2019.100377.

Liu, C., Lin, H., Li, B., Dong, Y., Yin, T., 2020. Responses of microbial communities and metabolic activities in the rhizosphere during phytoremediation of Cd-contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 202, 110958. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110958.

Martínez-Gallardo, M.R., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Sáez, J.A., Moral, R., Moreno, J., 2020. Bioremediation of Olive Mill Wastewater sediments in evaporation ponds through in situ composting assisted by bioaugmentation. *Sci. Total Environ.* 703, 135537. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135537.

Martínez-Gallardo, M. R., López, M. J., López-González, J. A., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., Pérez-Murcia, M. D., Sáez, J. A., Moral, R., Moreno, J., 2021. Microbial communities of the olive mill wastewater sludge stored in evaporation ponds: The resource for sustainable bioremediation. *J. Environ. Manage.* 279, 111810. doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111810.

Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2013. Review: effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 2(1), 15. doi.org/10.1186/2251-7715-2-15.

Mondini, C., Sánchez-Monedero, M. A., Sinicco, T., Leita, L., 2006. Evaluation of extracted organic carbon and microbial biomass as stability parameters in lignocellulosic waste composts. *J. Environ. Qual.* 35(6), 2313-2320. doi.org/10.2134/jeq2006.0055.

Ntougias, S., Bourtzis, K., Tsiamis, G., 2013. The microbiology of olive mill wastes. *BioMed Res. Int.* 2013. doi.org/10.1155/2013/784591.

Pardo, T., Bernal, P., Clemente, R., 2017. The use of olive mill waste to promote phytoremediation, in: Galanakis C.M. (Eds.), *Olive mill waste*. Academic Press, London, pp. 183–204. doi.org/10.1016/B978-0-12-805314-0.00009-1.

Pardo, T., Clemente, R., Epelde, L., Garbisu, C., Bernal, M. P., 2014. Evaluation of the phytostabilisation efficiency in a trace elements contaminated soil using soil health indicators. *J. Hazard. Mater.* 268, 68-76. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.01.003.

Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Kolar, B., 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology* 18(6), 395-402. doi.org/10.1002/tox.1014.

Pletsch, M., de Araujo, B. S., Charlwood, B. V., 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnol. Adv.* 17(8), 679-687. doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00028-2.

Prakash, V., Saxena, S., Sharma, A., Singh, S., Singh, S. K., 2015. Treatment of oil sludge contamination by composting. *J. Bioremed. Biodegrad.* 6(3), 1. doi.org/10.4172/2155-6199.1000284.

Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Ministerio de la Presidencia (in Spanish). <https://www.boe.es/boe/dias/2017/12/06/pdfs/BOE-A-2017-14332.pdf>.

Rékási, M., Mazsu, N., Draskovits, E., Bernhardt, B., Szabó, A., Rivier, P. A., Farkas, C., Borsányi, B., Pirkó, B., Molnár, S., Kátay, G., Uzinger, N., 2019. Comparing the agrochemical properties of compost and vermicomposts produced from municipal sewage sludge digestate. *Bioresour. Technol.* 291, 121861. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121861.

Sáez, J.A., Pérez-Murcia, M.D., Vico, A., Martínez-Gallardo, M.R., Andreu-Rodríguez, F.J., López, M.J., Bustamante, M.A., Sánchez-Hernández, J.C., Moreno, J., Moral, R., 2020. Olive mill wastewater-evaporation ponds long term stored: Integrated

assessment of in situ bioremediation strategies based on composting and vermicomposting. *J. Hazard. Mater.* 402, 123481. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123481.

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

Vinken, R., Schäffer, A., Ji, R., 2005. Abiotic association of soil-borne monomeric phenols with humic acids. *Org. Geochem.* 36(4), 583-593. doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.10.016.

Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodríguez, S., Benítez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.* 100(3), 1319-1326. doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.014.

Zmora-Nahum, S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen, Y., 2005. Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biol. Biochem.* 37(11), 2109-2116. doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.03.013.

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter, in: Gasser, J.K.R. (Eds.), *Composting of agricultural and other wastes*. Elsevier, London, UK, pp. 73-8.

VIII. Discusión

La disposición del alpechín en balsas de evaporación ha sido uno de los métodos más populares aplicados desde la década de los 70, tras la introducción en el mercado del método continuo trifásico de extracción de aceite de oliva (Kavvadias et al., 2017). El número de estanques de evaporación de alpechín en toda la cuenca mediterránea ha aumentado con el tiempo a la vez que se implementaba esta técnica para el manejo de dichos residuos (Jarboui et al., 2010; Komnitsas et al., 2016). Sin embargo, presenta muchos inconvenientes que repercuten en la salud ambiental, siendo el más importante la contaminación de los alrededores de las balsas, es decir, el suelo y las aguas subterráneas colindantes (Kavvadias et al., 2017). Por consiguiente, la gestión sostenible de los lodos o sedimentos de alpechín, resultantes de la acumulación de dicho residuo en este tipo de balsas de evaporación, así como la recuperación del terreno afectado, constituye una necesidad desde el punto de vista económico y sobre todo ambiental debido a los efectos negativos que ocasionan. La mayoría de las investigaciones que abordan la caracterización de los lodos de alpechín y su impacto en los suelos circundantes se centran en el análisis químico y fisicoquímico (Abid et al., 2006; Kavvadias et al., 2017; Komnitsas et al., 2016), mientras que el componente biótico apenas se tiene en cuenta. Estos estudios son importantes, ya que proporcionan información valiosa y necesaria para diseñar estrategias de biorremediación *in situ* para abordar el reto ambiental que la recuperación y aprovechamiento de los suelos de balsas de evaporación de alpechín supone, el cual es, además, el objetivo general de esta tesis. La correcta aplicación de estas técnicas requiere, del conocimiento tanto de las características intrínsecas de los lodos de alpechín, como del análisis de la extensión de la contaminación producida por los mismos cuando se almacenan en balsas sin la correcta protección e impermeabilización.

El primer objetivo específico planteado en esta Tesis Doctoral fue determinar tanto el impacto de los lodos de alpechín en la actividad biótica como la extensión alcanzada por el mismo. Para ello, se analizaron parámetros relacionados con la abundancia y la actividad microbiana (biomasa microbiana de carbono y respirometría), así como la toxicidad (ecotoxicidad y fitotoxicidad) en las capas de lodos y de suelo de dos balsas de evaporación. Los resultados globales mostraron que el efecto tóxico se limitó a la capa de lodos, mientras que tuvo un impacto menor en la capa de suelo.

Además, ambas capas contenían una biomasa microbiana relativamente abundante con una actividad metabólica natural restringida. Estudios anteriores sobre el efecto de la enmienda del suelo con alpechín o el impacto de los estanques de evaporación de alpechín mostraron una disminución de la materia orgánica y los compuestos fenólicos en relación con la mayor profundidad (Kavvadias et al., 2017, 2010; Komintzas et al., 2016; Sierra et al., 2001). La materia orgánica del alpechín es responsable de los aumentos de la carga microbiana, pero la presencia de los compuestos tóxicos suprime su actividad (Piotrowska et al., 2011). Por tanto, la mayor toxicidad en la capa superficial inhibe o ralentiza la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos y, por tanto, inhibe la respiración evitando la influencia favorable de su mayor contenido en nutrientes. Estas razones explican porqué la población microbiana autóctona no puede restaurar de forma natural este entorno.

En el capítulo 1, se comparan las características de lodos de alpechín almacenados durante largo tiempo en 7 estanques de evaporación con distinta configuración de un complejo de evaporación y se evalúa la extensión de sus efectos en la capa del suelo bajo dichos estanques que no estaban impermeabilizados. Para ello, el estudio se centró principalmente en el análisis del componente biótico, como factor clave para explicar las diferencias entre los distintos lodos de alpechín y sus efectos tóxicos, así como para determinar el potencial de recuperación del material tras la aplicación de estrategias de biorremediación. Según los resultados obtenidos en este estudio, los lodos de alpechín de distintas balsas de evaporación tenían características diferentes. Otros autores también encontraron diferencias en escenarios similares (Jarboui et al., 2010; Kavvadias et al., 2010; Komnitsas et al., 2016). Las diferencias se atribuyeron a la dinámica y la historia de los episodios de llenado- evaporación de los estanques y la duración del tiempo de almacenamiento de los lodos. Esto conduce a variaciones en las características fisicoquímicas y biológicas de los lodos que también podrían tener un impacto diferencial en el suelo subyacente.

Desde el punto de vista químico y fisicoquímico, atendiendo a los valores de humedad y pH, así como al contenido de materia orgánica, los lodos de alpechín existentes en las balsas de evaporación objeto de estudio se clasificaron en dos grupos: lodos secos minerales alcalinos, correspondientes a las balsas 2 y 3, y lodos húmedos orgánicos neutros, los acumulados de las balsas 4 a la 7 (Capítulo 1, Tabla 1). Estas diferencias se deben probablemente a la estratificación del material en suspensión, cuando

las balsas de evaporación estaban activas, que se asentó progresivamente desde la balsa de descarga (7) hasta las balsas más alejadas (1 a 3) (Capítulo 1, Fig. 1). La humedad se correlacionó positivamente con la materia orgánica, mientras que el pH se correlacionó negativamente con el contenido de materia orgánica y la humedad (Capítulo 1, Fig. 5). Teniendo en cuenta que el alpechín fresco es ligeramente ácido, con un pH que oscila entre 4 y 5,5 (Haouache y Bouchatela, 2016), los lodos orgánicos de los estanques 4 a 7 tenían valores de pH similares, mientras que los de los estanques 2 y 3, que tenían un pH superior a 9, eran muy diferentes. Esto apoya la posible mayor mineralización de alpechín como consecuencia de su almacenamiento en estos estanques, lo cual conduce a un aumento del pH debido a la liberación de cationes o formación de carbonatos (Barbera et al., 2013; Kavvadias et al., 2017). Otros parámetros que diferenciaron los lodos de alpechín entre estanques fueron la conductividad eléctrica (CE) y el contenido de polifenoles, que también mostraron una fuerte correlación positiva entre ellos (Capítulo 1, Fig. 6). El alpechín fresco se asocia generalmente con una CE alta (alrededor de 13 mS cm⁻¹) (Haouache y Bouchatela, 2016) y su contenido en polifenoles suele oscilar entre 0,1 y 4 g kg⁻¹ (Justino et al., 2012). Los bajos valores de CE en las balsas 7, 2 y 3 podrían explicarse por el efecto de lixiviación de efluentes (Kavvadias et al., 2017; Sierra et al., 2001) que puede producirse debido al gradiente del terreno. Por otro lado, los valores de fenoles totales en el alpechín fresco suelen ser muy inferiores a aquellos obtenidos en este trabajo para la mayoría de los lodos. Esto apoya el hecho de que los compuestos recalcitrantes se concentrarían con el tiempo en los lodos de alpechín almacenados (Abid et al., 2005; Jarboui et al., 2010). Se sabe que los parámetros químicos y fisicoquímicos influyen en la toxicidad del alpechín, concretamente, el contenido de compuestos polifenólicos, además de la alta salinidad (CE) (Babić et al., 2019; Isidori et al., 2005; Mekki et al., 2013). Sin embargo, los lodos del estanque 6 se situaron entre los menos tóxicos, a pesar de contener mayores valores de CE y polifenoles. Esto indica que definir la toxicidad de un material es mucho más compleja de lo que se consideraba a priori y que la evaluación precisa de dicha toxicidad sólo puede lograrse determinando su impacto sobre diferentes organismos modelo. En este trabajo, la ecotoxicidad fue evaluada con la prueba de bioluminiscencia, empleando la bacteria *Allivibrio fischeri*, y expresando los resultados como unidades de toxicidad (UT) (Capítulo 1, Figura 2). El valor medio obtenido fue de 35 UT (EC50=2,8%), lo cual concuerda bien con estudios anteriores sobre este mismo parámetro en el alpechín fresco (Amaral et al. 2012; Babić et al., 2019; Mekki et al., 2008). Por su parte, la fitotoxicidad probada en *L. sativum* y expresada en

porcentaje de índice de germinación (%IG), dio valores promedio de 55%, más elevado que el valor obtenido por Amaral et al. (2012) para el alpechín fresco (8%), probablemente debido a la degradación microbiana de compuestos fenólicos específicos que le confieren carácter fitotóxico durante el almacenamiento en las balsas.

En cuanto a la comunidad microbiana de los lodos de alpechín, tanto la cantidad como la biodiversidad y la actividad de los microorganismos fueron superiores a lo que cabría esperar para un entorno en el que existe un alto efecto antimicrobiano, y en el que los nutrientes fácilmente biodegradables son limitados y la presión osmótica es elevada (Ntougias et al., 2013; Sampedro et al., 2009). Las poblaciones de hongos y bacterias cultivables en la mayoría de los lodos fueron altas, con niveles para las bacterias en el rango de 10^5 - 10^8 UFC g⁻¹ y para los hongos 10^3 - 10^7 UFC g⁻¹. Ambos grupos microbianos, en sus niveles superiores, se acercaron a los valores encontrados en suelos no impactados (Bevivino y Dalmastrì, 2017; Vieira y Nahas, 2005). Así mismo, estos rangos fueron similares a los alcanzados por Jarboui et al. (2010) en lodos de alpechín de balsas de evaporación activas. Las bacterias dominaron cuantitativa y cualitativamente la comunidad microbiana sobre los hongos (Capítulo 1, Fig. 3 y Tabla 2). Estos resultados contradicen resultados anteriores que encontraron un predominio de los hongos frente a las bacterias en los lodos de alpechín almacenados en estanques de evaporación o en suelos enmendados con alpechín (Barbera et al., 2013; Jarboui et al., 2009; Kotsou et al., 2004; Sampedro et al., 2009). De todas formas, hay que tener en cuenta que, tras una exposición prolongada a condiciones estresantes, la población microbiana específica, tanto bacteriana como fúngica, se adapta, como demuestra la elevada proporción de bacterias y hongos degradadores de compuestos fenólicos en la mayoría de los estanques (Capítulo 1, Fig. 3). Esto es el resultado de la notable capacidad de los microorganismos para responder y adaptarse a los ambientes contaminados (Kotsou et al., 2004).

La estructura de la comunidad bacteriana estuvo dominada por el phylum *Actinobacteria* en los estanques alcalinos secos y minerales (estanques 2 y 3), mientras que las bacterias del phylum *Proteobacteria* destacaron en los estanques con mayor humedad, carga orgánica y pH neutro (estanques 4 a 7). Esta dominancia bacteriana también se ha encontrado en otros ambientes relacionados con alpechín (Hernández et al., 2018; Ntougias et al., 2013). Las variaciones a nivel de phylum entre estanques podrían atribuirse a diferencias fisicoquímicas y de disponibilidad de nutrientes, ya que concuerda con los requerimientos nutricionales y ambientales comunes para muchos representantes

de cada filo (Wolinska, 2019). En contraste con la distribución común de las bacterias entre los diferentes estanques, la comunidad fúngica estuvo dominada en cada estanque por un género concreto, como indicaron los bajos valores de uniformidad (Capítulo 1, Tabla 2). Los principales géneros fúngicos encontrados en alpechín han sido estudiados y caracterizados anteriormente por su capacidad de degradación de polifenoles, lo que explica su predominio en estos ambientes (Millán et al., 2000). Además, géneros fúngicos dominantes para cada balsa, tales como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Tritirachium*, *Scedosporium* y *Microascus*, han sido descritos anteriormente en ambientes relacionados con alpechín (Hernández et al., 2018; Ntougias et al., 2013). Por otro lado, el análisis funcional de las comunidades microbianas permite analizar las interacciones entre los organismos y el medio ambiente (Escalas et al., 2019). En este trabajo, se empleó la técnica Biolog Ecoplate que revela las poblaciones más activas dentro de la comunidad microbiana y, por tanto, los patrones fisiológicos de la comunidad (Feigl et al., 2017). Los resultados mostraron que la disponibilidad de sustratos contenidos en la materia orgánica y la presión tóxica fueron los principales factores que influyeron en la diversidad funcional de la comunidad microbiana de los lodos de alpechín. Así, la muestra de la balsa 6, que fue la menos tóxica, presentó la mayor intensidad y diversidad de actividad microbiana (Capítulo 1, Tabla 3). El metabolismo de los polímeros fue la actividad metabólica predominante en la mayoría de las balsas, seguida del metabolismo de ácidos carboxílicos y carbohidratos, tal y como mostraron previamente Hentati et al. (2016) tras el análisis de muestras tomadas en las cercanías de una balsa de evaporación de alpechín. Por último, hay que destacar que, a pesar de la presión tóxica registrada, la mayoría de las muestras de lodos presentaron una amplia gama de actividades metabólicas que además estaban equilibradas (Capítulo 1, Tabla 3 y Fig. 4). Este análisis refleja la biodiversidad metabólica real de la comunidad microbiana de las balsas, así como pone de manifiesto el conjunto de funcionalidades que podrían potenciarse con una gestión adecuada del entorno.

En el segundo objetivo específico (Objetivo 2, Capítulo 2) se abordó la búsqueda selectiva de microorganismos capaces de degradar o metabolizar los compuestos recalcitrantes del alpechín para poder aplicarlos en estrategias de biorremediación. De acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo 1, los lodos de las balsas de alpechín albergaban especies microbianas adaptadas a la presencia de sustancias tóxicas propias del residuo, como los compuestos polifenólicos, que actúan inhibiendo el crecimiento de

otros microorganismos. Estas poblaciones autóctonas de los lodos de alpechín, han desarrollado, debido a la presión selectiva, capacidades metabólicas relacionadas con la degradación del residuo que les sirve como hábitat para poder nutrirse de dicho material, tal y como han demostrado también otros estudios (Maza-Márquez et al., 2013).

Como se demostró previamente, los lodos de alpechín son muy complejos en su composición. Por ello, los procedimientos de cribado y selección de microorganismos de este estudio se diseñaron para cubrir un amplio rango de actividades degradadoras. Así mismo, se tuvo en cuenta el destino de los microorganismos más prometedores como inoculantes en tareas de bioaumentación, para implementar las estrategias de biorremediación. En este sentido, se utilizó una batería de pruebas cualitativas y cuantitativas para la selección de las cepas aisladas con el fin de demostrar la expresión de enzimas y actividades directa o indirectamente implicadas en la degradación de los compuestos del alpechín (Capítulo 2, Tabla 2). Además, se realizaron incubaciones a dos temperaturas diferentes, 30 °C y 50 °C, para asegurar el aislamiento de microorganismos que pudieran resistir las fluctuaciones térmicas características de una de las estrategias de biorremediación que se aplicaron, el compostaje.

Los compuestos polifenólicos, como principales responsables de los efectos tóxicos del alpechín, se situaron como meta prioritaria en la búsqueda de microbiota especializada en su transformación. Así, los medios de cultivo utilizados para el aislamiento incluyeron el ácido tánico, como compuesto modelo de polifenol, o el tirosol, como unidad estructural de polifenol, siendo la enzima implicada en su degradación la polifenoloxidasas. Zerva et al. (2017) demostraron su producción por dos especies fúngicas durante la degradación de alpechín mostrando una alta capacidad por parte de esta enzima para la oxidación de compuestos fenólicos. También se exploró la capacidad de degradar la lignina por su relación con la actividad de los compuestos fenólicos. Para ello, se utilizó el colorante antraquinónico RBBR en medios de cultivo sólido para detectar el potencial ligninolítico mediante su decoloración (Palmieri et al., 2005), así como la producción de varias enzimas ligninolíticas y degradadoras de fenoles (peroxidasa, ligninasa, lacasa, oxidasa y tirosinasa). Martínková et al. (2016) comprobaron la capacidad potencial de las lacasas y tirosinasas como enzimas degradadoras de la gran variedad de compuestos fenólicos presentes en el alpechín. Las pruebas analíticas, cualitativas y cuantitativas, permitieron la preselección de 8 cepas: 6 hongos, 1 actinobacteria y 1 bacteria (Capítulo 2, Tabla 3). Esta selección se realizó en

función del número de actividades relacionadas con la degradación de fenoles (tres o más actividades positivas), el grupo microbiano y la capacidad de degradar tirosol. De acuerdo con estos criterios, en general, las 8 cepas mostraron un rango de actividades metabólicas y capacidades fisiológicas adecuadas para la biorremediación de ambientes contaminados con alpechín. Sin embargo, se seleccionaron los hongos H2 y H16, identificados como *Aspergillus ochraceus* y *Scedosporium apiospermum*, teniendo en cuenta el rango de actividades relacionadas con el metabolismo de compuestos recalcitrantes, así como la capacidad de degradar el tirosol. *S. apiospermum* es un hongo perteneciente al filo *Ascomycota*, que ha sido aislado comúnmente en suelos y aguas contaminadas, lo cual ha derivado en multitud de investigaciones sobre su uso como agente en biorremediación (Rougeron et al., 2018). Este hongo también ha sido caracterizado como un microorganismo degradador de hidrocarburos y sus derivados (Clauben y Schmidt, 1998). El género *Aspergillus*, por su parte, también ha sido ampliamente estudiado para su uso en biorremediación debido a su versatilidad para biotransformar o co-metabolizar una amplia variedad de compuestos tóxicos como tintes textiles, compuestos aromáticos, pesticidas, etc. (Sharma et al., 2018). La especie *Aspergillus ochraceus* fue propuesta en otro trabajo para el tratamiento de lodos de alpechín debido a su capacidad de crecimiento en presencia de compuestos fenólicos (Bevilacqua et al., 2017).

Con el fin de determinar algunos aspectos prácticos relacionados con la aplicación combinada de *A. ochraceus* H2 y *S. apiospermum* H16 en experimentos de campo, se comprobó el rango de crecimiento térmico de ambos microorganismos, su compatibilidad y su potencial capacidad de degradación sinérgica. *A. ochraceus* H2 creció *in vitro* a 25 °C y 30 °C, con mayor vigor a esta última temperatura, como también han propuesto otros autores (Palacios-Cabrera et al., 2005). *S. apiospermum* H16 creció *in vitro* entre 25 °C y 40 °C como máximo, como también fue reportado por Clauben y Schmidt (1998). En general, no se observó ningún efecto inhibitorio de un hongo frente al otro, como refleja la superposición del micelio de ambos hongos a 25 °C (Capítulo 2, Fig. 3). Los dos hongos fueron cultivados en medio líquido con tirosol, por separado y conjuntamente, para determinar la potencial existencia de un efecto sinérgico en la degradación de este compuesto. Este experimento reveló que los hongos H2 y H16 juntos eran capaces de eliminar completamente el tirosol (100%). Según estos resultados, un cultivo mixto de ambos hongos puede ser cultivado y aplicado en co-cultivo, como un consorcio. Además, el hecho de que ambos cubrieran conjuntamente un rango de temperatura de crecimiento

entre las condiciones mesófilas y las termotolerantes beneficia claramente su persistencia bajo las fluctuaciones térmicas habitualmente alcanzadas durante el proceso de compostaje. Los hongos mesófilos persisten en las capas exteriores de las pilas de compostaje o como esporas durante las etapas termófilas y vuelven a colonizar cuando la temperatura desciende lo suficiente (Gaur et al., 1982). Por esta razón, a pesar de que el inóculo fue aplicado al inicio de las estrategias de biorremediación, aunque la temperatura óptima para el crecimiento de H2 y H16 sea de 30 y 40 °C, respectivamente, se prevee que estén presentes a lo largo de todo el proceso.

El estudio físico-químico y biológico de los lodos de alpechín, aportó información suficiente sobre dichos residuos para poder, en el último tramo del estudio, seleccionar y comparar cuatro tratamientos de biorremediación con el fin de evaluar, entre ellos, el más eficiente y sostenible para gestionar los lodos de alpechín acumulados en las balsas de evaporación (Objetivo 3, Capítulos 3 y 4). Por otro lado, la identificación de los recursos biológicos presentes en los lodos permitió obtener un consorcio microbiano con potencial biotecnológico como herramienta para biodegradar el alpechín, de modo que los microorganismos más interesantes puedan utilizarse para implementar las estrategias de biorremediación y así mejorar la eficacia biodescontaminadora de cada una de ellas. Por ende, la finalidad de esta investigación no fue solamente la eliminación de la toxicidad presente en el terreno, derivada de la acumulación del alpechín, sino también el aprovechamiento de estos residuos contaminantes, junto con otros materiales orgánicos residuales de origen agrícola y ganadero, para obtener productos y servicios de valor añadido. La selección de las estrategias de biorremediación, tales como landfarming, fitorremediación, compostaje y compo-vermicompostaje, se apoyó en su capacidad para promover la descomposición natural de la materia orgánica en sustancias inorgánicas y materia orgánica estable mediante la actividad de los microorganismos (Prakash et al., 2015), lo que permite finalmente la reducción o eliminación de la contaminación provocada principalmente por los compuestos recalcitrantes del alpechín, además de la obtención de un producto de interés agronómico. Para determinar la idoneidad de los subproductos conseguidos, se analizaron parámetros asociados con la toxicidad (fitotoxicidad y ecotoxicidad) del material, así como aquellos implicados en la estabilidad del producto final, como la evolución del carbono soluble en agua liberado (WSC), la materia orgánica estabilizada en forma de compuestos húmicos (THE), y el carbono de la biomasa microbiana (CBIO) (Capítulo 4, Figura 1). Por otro lado, dado que cada uno de

los biotratamientos mencionados implica condiciones diferentes a diversos niveles, el estudio de la diversidad funcional de la comunidad microbiana se llevó a cabo con objeto de obtener información sobre el rendimiento de cada técnica para la descontaminación y la recuperación segura de los lodos de alpechín. Por lo tanto, en uno de los trabajos derivados del último objetivo específico de esta Tesis Doctoral también se analizó la biodiversidad metabólica a lo largo del tiempo para los cuatro biotratamientos (Capítulo 4, Figura 2). Paralelamente, se llevó a cabo un estudio más exhaustivo respecto a la eficacia biorremediadora de las estrategias de compostaje y vermicompostaje (Capítulo 2, Figura 4 y Tabla 2; Capítulo 3, Figura 1-4 y Tablas 1-4), puesto que se esperaba una mayor biodegradación y transformación del material derivado de estos procesos, los cuales, además, permiten la obtención final de productos maduros y con fines fertilizantes (compost y vermicompost), a diferencia de la fitorremediación y landfarming que propician la recuperación y obtención final de un suelo para uso agrícola.

Los resultados globales mostraron que los biotratamientos de compostaje y vermicompostaje descontaminaron con éxito los lodos de alpechín remanentes en las balsas de evaporación, además de transformarlos, junto con los residuos orgánicos adicionados a la mezcla inicial de sendos procesos, en un producto maduro y estable. Los valores de carbono hidrosoluble alcanzados en ambos procesos se encontraron muy por debajo del umbral mínimo considerado adecuado para establecer que un compost pueda ser valorado como suficientemente maduro y estable (4 mg g^{-1}) (Zmora-Nahum et al., 2005). Además, la tendencia de las sustancias húmicas estuvo relacionada negativamente con el carbono hidrosoluble, como era de esperar debido a la degradación y humificación de la materia orgánica (Mondini et al., 2006). En este parámetro fue notable el efecto de la bioaumentación, ya que el consorcio fúngico pareció mejorar el proceso de humificación debido a su alta capacidad de degradación de compuestos fenólicos y la posterior incorporación de monómeros al complejo húmico (Barje et al., 2010). Cabe destacar que durante el proceso de vermicompostaje los valores del contenido en sustancias húmicas y el carbono hidrosoluble liberado fueron mayores que en el compostaje. Este fenómeno puede ser explicado por el efecto positivo atribuido a las lombrices en la mejora de la degradación de la materia orgánica residual, así como de los compuestos más recalcitrantes que pudieran permanecer en el material pre-compostado (Rékási et al., 2019). Por otro lado, la pila de vermicompostaje inoculada con el consorcio microbiano mostró, al final del proceso, una reducción de la abundancia microbiana

(CBIO). Esto se podría explicar por el efecto negativo que la digestión de la materia orgánica por parte de las lombrices puede provocar en la biomasa microbiana debido al agotamiento de los recursos disponibles (Domínguez, 2011). La técnica de landfarming no fue tan eficiente en la biorremediación y estabilización del material porque la actuación de los microorganismos fue más lenta debido a las condiciones del proceso. Los valores de carbono hidrosoluble al final del proceso fueron muy altos en comparación con el proceso de compostaje o vermicompostaje, ya que su liberación es más lenta por tratarse de un proceso de descomposición de materia orgánica más lento (Koul y Taak, 2018). Por otro lado, la fitorremediación se posicionó como un biotratamiento adecuado para la eliminación de los contaminantes en los suelos, siendo más eficaz cuando las plantas se establecieron en un sustrato fértil. Este proceso favorece la bioestimulación de la microbiota de la rizosfera y la fitoestabilización por su capacidad para incorporar los contaminantes a las sustancias húmicas y reducir su biodisponibilidad (Cunningham et al., 1996). Algunos estudios apoyan que la presencia de compuestos fenólicos desencadena la producción de enzimas específicas por parte de las plantas, como las peroxidasas, que participan en el metabolismo y la eliminación de estas sustancias (Pletsch et al., 1999). Esto explica el elevado aumento de las sustancias húmicas, que resultó, como se mencionó anteriormente, de una detección incorrecta de las sustancias fenólicas en su lugar.

Por otro lado, el estudio del perfil fisiológico característico de cada estrategia ofreció también información relevante sobre su eficacia biorremediadora. La incorporación inicial de nutrientes, mediante la adición de materia orgánica residual, estimuló la actividad y el crecimiento de la microbiota indígena, lo cual se vio reflejado en el aumento del potencial metabólico de la mezcla inicial que se usó para constituir todas las estrategias. Este efecto de bioestimulación favoreció el desarrollo de la microbiota capaz de descontaminar el alpechín, permitiendo una mayor colonización y transformación de la materia orgánica residual por parte de microorganismos que previamente no hubieran podido habitar ese tipo de material (Ntougias et al., 2013). En comparación con el estado metabólico inicial de los lodos de alpechín, todos los biotratamientos favorecieron el aumento de la actividad metabólica en la comunidad microbiana. Resultados similares fueron mostrados anteriormente por otros autores como Pardo et al. (2014), que demostraron que la incorporación de materia orgánica al suelo provocó un aumento de la diversidad funcional. Además, el análisis metabólico por

sustrato (SAWCD) del producto final obtenido tras cada biotratamiento reveló un perfil muy similar, mostrando los siguientes rangos de valores de utilización de sustratos: 14-22 % en hidratos de carbono; 20-26 % en polímeros; 13-22 % en aminoácidos; 11-21 % en ácidos carboxílicos; 8-17 % en compuestos fenólicos; y 8-17 % en aminas, con la excepción del material final del biotratamiento de fitorremediación inoculado donde este valor alcanzó un 25 %. Este aumento de la actividad relacionada con el uso de compuestos con grupos aminos, en comparación con el resto, podría justificarse por el efecto del inóculo fúngico que potencia el papel de los microorganismos de la rizosfera en el uso de sustratos que contienen nitrógeno (Liu et al., 2020). Sin embargo, el proceso de vermicompostaje mostró un mayor aumento en la biodiversidad funcional (H') y abundancia metabólica (AWCD), así como el patrón más equilibrado de utilización de sustratos (SAWCD). Estos resultados han demostrado que los biotratamientos aplicados son procesos óptimos para estimular la biodegradación de la materia orgánica por parte de la comunidad microbiana presente en las matrices de alpechín, destacando el vermicompostaje puesto que da lugar finalmente al producto más estable y funcionalmente equilibrado (Ntougias., 2013; Federici., 2011; Vivas et al., 2009). Algunos autores afirman que la acción conjunta de la microbiota autóctona de la pila de compostaje y la presente en el intestino de las lombrices en condiciones controladas favorece la biooxidación acelerada de la materia orgánica que caracteriza el producto final obtenido (Vivas et al., 2009). Otros autores han reportado un aumento de la funcionalidad microbiana directamente proporcional al crecimiento de la biomasa de lombriz en tratamientos de vermicompostaje (García-Sánchez et al., 2017). Por otro lado, cabe mencionar que el consorcio microbiano mejoró significativamente la diversidad y la abundancia en la mayoría de los tratamientos.

Para reflejar la eficacia de cada uno de los biotratamientos aquí aplicados, para la biodescontaminación de los lodos de alpechín, se analizó la evolución de la toxicidad del material (fitotoxicidad y ecotoxicidad) durante cada proceso de biorremediación (Capítulo 4, Tabla 1). Todos los tratamientos biológicos favorecieron la reducción de la toxicidad al transformar los lodos de alpechín, junto con la materia orgánica de residuos agrícolas y ganaderos adicionada, en un material con valores de ecotoxicidad y fitotoxicidad inferiores a 1 UT y superiores al 80 % de IG, respectivamente, lo que se considera una toxicidad leve o nula. En el material final procedente de la fitorremediación y del vermicompostaje se alcanzaron valores de UT inferiores a 0,4, lo que significa

ausencia de ecotoxicidad, siendo este último el mejor biotratamiento para eliminar la ecotoxicidad. Sin embargo, los valores más altos de IG se encontraron en el material final procedente del compostaje, superando en este caso el 100 % de IG (117,88 y 129,24 % de IG en las pilas no inoculadas e inoculadas, respectivamente), lo que significa que el material obtenido presentó propiedades fitoestimulantes. Cabe destacar que la fitorremediación consiguió la desaparición de la ecotoxicidad, pero el material final obtenido era moderadamente fitotóxico. Algunos autores han demostrado la capacidad de ciertas especies vegetales para eliminar compuestos contaminantes presentes en el suelo a través de diversos mecanismos, entre los que se encuentran la asimilación de los compuestos tóxicos en sus estructuras mediante un proceso de fitoextracción, así como el desarrollo de mecanismos de rivalidad contra las plantas circundantes mediante la liberación de moléculas fitotóxicas (Cunningham et al., 1996). De este modo, son fácilmente explicables los bajos valores de IG presentes en estos productos finales. El vermicompostaje demostró ser un biotratamiento eficaz para reducir la toxicidad de los lodos de alpechín y apoyó lo mencionado anteriormente, basándose en la capacidad de las lombrices de estimular la biodiversidad funcional de los lodos, lo que favoreció el agotamiento de compuestos potencialmente tóxicos, como los compuestos fenólicos. Sin embargo, el compostaje aseguró un producto final con capacidad fitoestimulante, convirtiéndolo en una enmienda orgánica de interés agronómico (Martínez-Gallardo et al., 2020; Sáez et al., 2020). Por otro lado, la inoculación no tuvo efecto en la reducción de la ecotoxicidad, pero sí en la eficacia de los biotratamientos de landfarming y compostaje en cuanto a la reducción de la fitotoxicidad e incluso, en este último caso, en la mejora del efecto fitoestimulante. Como se mencionó anteriormente, se realizó un estudio más exhaustivo en las pilas de compostaje y vermicompostaje que aportó información relevante sobre la eficacia de estos tratamientos en la biorremediación de lodos de alechín. Uno de los parámetros analizados fue el contenido en compuestos fenólicos, que reveló una fuerte disminución en la primera etapa del compostaje, una vez que las temperaturas habían alcanzado valores termófilos, seguida de una desaceleración en la tasa de degradación hasta alcanzar concentraciones en torno a 2000 mg kg⁻¹ en el compostaje y 400 mg kg⁻¹ en el vermicompostaje (Capítulo 3, Figura 3 y Tabla 3). La rápida disminución de los compuestos fenólicos en las primeras semanas del compostaje se debió principalmente a las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso (Capítulo 3, Figura 1) que aceleraron la biodegradación (Albuquerque et al., 2006). Por ejemplo, exoenzimas, como la polifenoloxidasas liberada por el hongo *Aspergillus* spp., participan

en la descomposición de los compuestos fenólicos durante la fase termófila del compostaje (Chowdhury et al., 2013). Por tanto, teniendo en cuenta que estos compuestos fenólicos y lignocelulósicos son sustancias altamente resistentes a la degradación, y que el compostaje y el vermicompostaje son capaces de degradarlas y reducirlas, se pueden considerar estas estrategias adecuadas para su uso en la biorremediación de lodos de alpechín. Por otro lado, las pilas inoculadas mostraron un leve ascenso del contenido fenólico en la fase de maduración (Capítulo 2, Figura 4 y Tabla 2). Este fenómeno ha sido descrito previamente por Jurado et al. (2015) durante el compostaje de residuos lignocelulósicos bioaumentados. Esto puede deberse a la liberación de fenoles asociados a la matriz lignocelulósica de las enmiendas de residuos orgánicos incorporados a la mezcla inicial, como consecuencia de una degradación microbiana más intensa de la fracción correspondiente a la lignina en las pilas inoculadas, más que a los fenoles propios del alpechín.

De acuerdo con los resultados anteriormente comentados sobre madurez y toxicidad, así como con el estudio funcional, el material final procedente del compostaje y del vermicompostaje es un sustrato adecuado y apto para fines agrícolas. Por otra parte, los parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad del compost y vermicompost inoculados (Capítulo 3, Tabla 4; Capítulo 4, Tabla 1 y 2), contrastaron con los encontrados como óptimos en la literatura consultada, aún así se situaron dentro de los límites establecidos por la legislación. En definitiva, la suplementación de los lodos de alpechín con residuos orgánicos, combinado con la bioaumentación mediante un consorcio fúngico especializado, aumentó la eficiencia de todos los biotratamientos ensayados para la revalorización de los residuos objeto de estudio en productos de interés comercial en el marco de la economía circular. El landfarming y la fitorremediación favorecieron la descontaminación de los lodos de alpechín, dando lugar a la restauración y limpieza del suelo. Por su parte, el compostaje y el vermicompostaje ofrecieron condiciones ideales para transformar los lodos en un material estable y adecuado para fines agrícolas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la combinación de varias técnicas de biorremediación como el compostaje o el vermicompostaje, seguido de la fitorremediación, podría ser la solución más adecuada y sostenible para aplicar en suelos contaminados con alpechín, permitiendo la recuperación, el reciclado y la revalorización de los residuos en productos con valor añadido para su empleo como enmienda agronómica de alta calidad.

Referencias

Abid, N., Aloui, F., Dhouib, A., Sayadi, S., 2006. Olive mill wastewater sludge from evaporation ponds: evolution of physico-chemical parameters during storage and composting process. *Environ. Technol.* 27(2), 127-136.

Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2006. Effects of bulking agent of the composting of “alperujo” the solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Process Biochemistry* 41, 127,132.

Amaral, C., Lucas, M.S., Sampaio, A., Peres, J.A., Dias, A.A., Peixoto, F., Pais, C., 2012. Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Int. Biodet. Biodegr.* 68, 45-50.

Babić, S., Malev, O., Pflieger, M., Lebedev, A.T., Mazur, D.M., Kužić, A., Trebše, P., 2019. Toxicity evaluation of olive oil mill wastewater and its polar fraction using multiple whole-organism bioassays. *Sci. Total Environ.* 686, 903-914.

Barbera, A.C., Maucieri, C., Cavallaro, V., Ioppolo, A., Spagna, G., 2013. Effects of spreading olive mill wastewater on soil properties and crops, a review. *Agr. Water Manage.* 119, 43-53.

Barje, F., El Fels, L., El Hajjouji, H., Amir, S., Winterton, P., Hafidi, M., 2012. Molecular behaviour of humic acid-like substances during co-composting of olive mill waste and the organic part of municipal solid waste. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 74: 17-23.

Bevilacqua, A., Cibelli, F., Raimondo, M.L., Carlucci, A., Lops, F., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2017. Fungal bioremediation of olive mill wastewater: using a multi-step approach to model inhibition or stimulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(2), 461-468.

Bevivino, A., Dalmastri, C., 2017. Impact of agricultural land management on soil bacterial community: a case study in the Mediterranean area, in: Lukac, M., Grenni, P., Gamboni, M. (Eds.), *Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience*. Springer, Switzerland, pp. 77-95.

Clauben, M., Schmidt, S., 1998. Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Research in Microbiology* 149(6), 399-406.

Chowdhury, A.K.M.M.B., Akrotos, C.S., Vayenas, D.V., Paylou, S., 2013. Olive mill waste composting: a review. *Inter. Biodeterior, Biodegradation* 85, 108-119.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56(1), 55-114.

Domínguez, J., 2011. The Microbiology of Vermicomposting. In: *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*; Edwards, C.A., Norman, Q. A., Sherman, R., Eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, pp 53–66.

Escalas, A., Hale, L., Voordeckers, J.W., Yang, Y., Firestone, M.K., Alvarez-Cohen, L., Zhou, J., 2019. Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecol. Evol.* 9(20), 12000-12016.

Federici, E., Pepi, M., Esposito, A., Scargetta, S., Fidati, L., Gasperini, S., Cenci, G., Altieri, R., 2011. Two-phase olive mill waste composting: community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresour. Technol.* 102(23), 10965-10972.

Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszita, E., Molnár, M., 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Sci. Total Environ.* 595, 903-911.

García-Sánchez, M., Taušnerová, H., Hanč, A., Tlustoš, P., 2017. Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: Changes in chemical and biological parameters. *Waste Manage.* 62, 33-42.

Gaur, A.C., Sadasivam, K.V., Mathur, R.S., Magu, S.P., 1982. Role of mesophilic fungi in composting. *Agricultural Wastes* 4(6), 453-460.

Hentati, O., Oliveira, V., Sena, C., Bouji, M.S.M., Wali, A., Ksibi, M., 2016. Soil contamination with olive mill wastes negatively affects microbial communities, invertebrates and plants. *Ecotoxicology* 25(8), 1500-1513.

Hernández, D., Astudillo, C.A., Fernández-Palacios, E., Cataldo, F., Tenreiro, C., Gabriel, D., 2018. Evolution of physical-chemical parameters, microbial diversity and

VOC emissions of olive oil mill waste exposed to ambient conditions in open reservoirs. *Waste Manage.* 79, 501-509.

Haouache, N., Bouchaleta, A., 2016. Olive mill wastewater: Effect on the survival and reproduction of the ecological indicator “*Gammarus gauthieri*”. *J. Mater. Environ. Sci.* 7(7), 2288-2294.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., 2005. Model study on the effect of 15 phenolic olive mill wastewater constituents on seed germination and *Vibrio fischeri* metabolism. *J. Agr. Food Chem.* 53(21), 8414-8417.

Jarboui, R., Chtourou, M., Azri, C., Gharsallah, N., Ammar, E., 2010. Time-dependent evolution of olive mill wastewater sludge organic and inorganic components and resident microbiota in multi-pond evaporation system. *Bioresour. Technol.* 101(15), 5749-5758.

Jarboui, R., Hadrich, B., Gharsallah, N., Ammar, E., 2009. Olive mill wastewater disposal in evaporation ponds in Sfax (Tunisia): moisture content effect on microbiological and physical chemical parameters. *Biodegradation* 20(6), 845.

Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Moreno, J., 2015. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 186, 15-24.

Justino, C.I., Pereira, R., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T.A., Panteleitchouk, T.S., Duarte, A.C., 2012. Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicology* 21(2), 615-629.

Kavvadias, V., Doula, M.K., Komnitsas, K., Liakopoulou, N., 2010. Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *J. Hazard. Mater.* 182(1-3), 144-155.

Kavvadias, V., Elaiopoulos, K., Theocharopoulos, S., Soupios, P., 2017. Fate of potential contaminants due to disposal of olive mill wastewaters in unprotected evaporation ponds. *B. Environ. Contam. Tox.* 98, 323-330. doi.org/10.1007/s00128-016-1922-4.

Komnitsas, K., Modis, K., Doula, M., Kavvadias, V., Sideri, D., Zaharaki, D., 2016. Geostatistical estimation of risk for soil and water in the vicinity of olive mill wastewater disposal sites. *Desalin. Water Treat.* 57, 2982-2995.

Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C., Kyriacou, A., 2004. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Appl. Soil Ecol.* 26(2), 113-121.

Koul, B., Taak, P., 2018. Ex situ soil remediation strategies. In: *Biotechnological Strategies for Effective Remediation of Polluted Soil*. Springer, Singapore, pp. 39-57.

Liu, C., Lin, H., Li, B., Dong, Y., Yin, T., 2020. Responses of microbial communities and metabolic activities in the rhizosphere during phytoremediation of Cd-contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 202, 110958.

Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., Homolka, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: a review. *Chemosphere* 149, 373-382.

Maza-Márquez, P., Martínez-Toledo, M. V., González-López, J., Rodelas, B., Juárez-Jiménez, B., Fenice, M., 2013. Biodegradation of olive washing wastewater pollutants by highly efficient phenol-degrading strains selected from adapted bacterial community. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 82, 192-198.

Mekki, A., Dhouib, A., Feki, F., Sayadi, S., 2008. Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests. *Ecotox. Environ. Safe.* 69(3), 488-495.

Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S., 2013. Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 2(1), 15.

Millán, B., Lucas, R., Robles, A., García, T., de Cienfuegos, G.A., Gálvez, A., 2000. A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential. *Microbiol. Res.* 155(3), 143-147.

Mondini, C., Sánchez-Monedero, M. A., Sinicco, T., Leita, L., 2006. Evaluation of extracted organic carbon and microbial biomass as stability parameters in lignocellulosic waste composts. *J. Environ. Qual.* 35(6), 2313-2320.

Ntougias, S., Bourtzis, K., Tsiamis, G., 2013. The microbiology of olive mill wastes. *BioMed Res. Int.* 2013.

Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M.H., Hashimoto, J.M., Menezes, H.C.D., 2005. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology* 36(1), 24-28.

Palmieri, G., Cennamo, G., Sannia, G., 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology* 36(1), 17-24.

Pardo, T., Clemente, R., Epelde, L., Garbisu, C., Bernal, M. P., 2014. Evaluation of the phytostabilisation efficiency in a trace elements contaminated soil using soil health indicators. *J. Hazard. Mater.* 268, 68-76.

Piotrowska, A., Iamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L., 2006. Short-term effects of olive mill waste water (OMW) on chemical and biochemical properties of a semiarid Mediterranean soil. *Soil Biol. Biochem.* 38(3), 600-610.

Pletsch, M., de Araujo, B. S., Charlwood, B. V., 1999. Novel biotechnological approaches in environmental remediation research. *Biotechnol. Adv.* 17(8), 679-687.

Rékási, M., Nikolett Mazsu, Eszter Draskovits, Botond Bernhardt, Anita Szabó, Pierre-Adrien Rivier, Csilla Farkas, Barbara Borsányi, Béla Pirkó, Sándor Molnár, György Kátay, Nikolett Uzinger. 2019. Comparing the agrochemical properties of compost and vermicomposts produced from municipal sewage sludge digestate. *Bioresour. Tech.* 291, 121886.

Rougeron, A., Giraud, S., Alastruey-Izquierdo, A., Cano-Lira, J., Rainer, J., Mouhajir, A., Bouchara, J.P., 2018. Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research. *Mycopathologia* 183(1), 185-200.

Sampedro, I., Giubilei, M., Cajthaml, T., Federici, E., Federici, F., Petruccioli, M., D'annibale, A., 2009. Short-term impact of dry olive mill residue addition to soil on the resident microbiota. *Bioresour. Technol.* 100(23), 6098-6106.

Sharma, B., Dangi, A.K., Shukla, P., 2018. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of Environmental Management* 210, 10-22.

Sierra, J., Martí, E., Montserrat, G., Cruanas, R., Garau, M.A., 2001. Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal. *Sci. Total Environ.* 279(1-3), 207-214.

Vieira, F.C.S., Nahas, E., 2005. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiol. Res.* 160(2), 197-202.

Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Benítez, E., 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.* 100(3), 1319-1326.

Wolinska, A., 2019. Metagenomic achievements in microbial diversity determination in croplands: A review, in: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), *Microbial Diversity in the Genomic Era*, Academic Press, Elsevier Inc., pp. 15-35.

Zerva, A., Zervakis, G.I., Christakopoulos, P., Topakas, E., 2017. Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *Journal of Environmental Management* 203, 791-798.

Zmora-Nahum, S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen, Y., 2005. Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity. *Soil Biol. Biochem.* 37(11), 2109-2116.

IX. Conclusiones

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

1. Los lodos de alpechín almacenados en balsas de evaporación presentan un marcado carácter ecotóxico y fitotóxico, cuyo efecto en el entorno estudiado se limita a la capa de lodo, sin afectar a la capa de suelo subyacente. De acuerdo con esto, la implementación de estrategias de biorremediación *in situ* no requiere de excavado profundo en la balsa para garantizar la contención del efecto contaminante.
2. La microbiota autóctona de los lodos de alpechín es abundante, diversa y con un elevado potencial metabólico, pero sus capacidades, en condiciones naturales, se ven limitadas por las características restrictivas de los lodos. La incorporación de residuos orgánicos a los mismos permite balancear los nutrientes necesarios y, por tanto, estimular la actividad de la microbiota residente.
3. Los lodos de alpechín presentan una elevada proporción de microorganismos degradadores de polifenoles y adaptados a las condiciones extremas impuestas por la matriz de lodo concentrada. Entre esta comunidad, los hongos *Aspergillus ochraceus* H2 y *Scedosporium apiospermum* H16 destacan por presentar un amplio espectro de actividades enzimáticas y ser capaces de degradar completamente el compuesto fenólico tirosol en cultivo mixto, lo que los convierte en un consorcio competitivo para emplear como inoculantes en tareas de bioaumentación que implementen estrategias de biorremediación.
4. La suplementación de los lodos de alpechín con residuos orgánicos, combinada con la bioaumentación mediante el consorcio fúngico especializado, aumenta la eficiencia de los biotratamientos, ya que permite la eliminación casi completa de la fitotoxicidad y ecotoxicidad de los lodos de alpechín.
5. El landfarming y la fitorremediación contribuyen a la mejora de las características de los lodos como sustratos, favoreciendo su descontaminación.
6. El vermicompostaje ocasiona una mayor reducción de la ecotoxicidad, en comparación con el compostaje, y favorece la consolidación de una mayor biodiversidad funcional en el producto final. Sin embargo, el proceso de compostaje permite, por sí solo, la obtención de un sustrato fitoestimulante.

7. El compostaje y el vermicompostaje proporcionan las condiciones ideales para la valorización de los lodos de alpechín, permitiendo la transformación de materiales tóxicos en productos libres de contaminación y con características agronómicas idóneas para su uso en sistemas agrícolas.

Foto de contraportada: “Mar de lacre”. Colonias de microorganismos de muestras de lodos de alpechín en medio RBBR para la detección de actividad ligninolítica.

Fotografía ganadora del premio “Federico Uruburu” (SEM, 2019)

