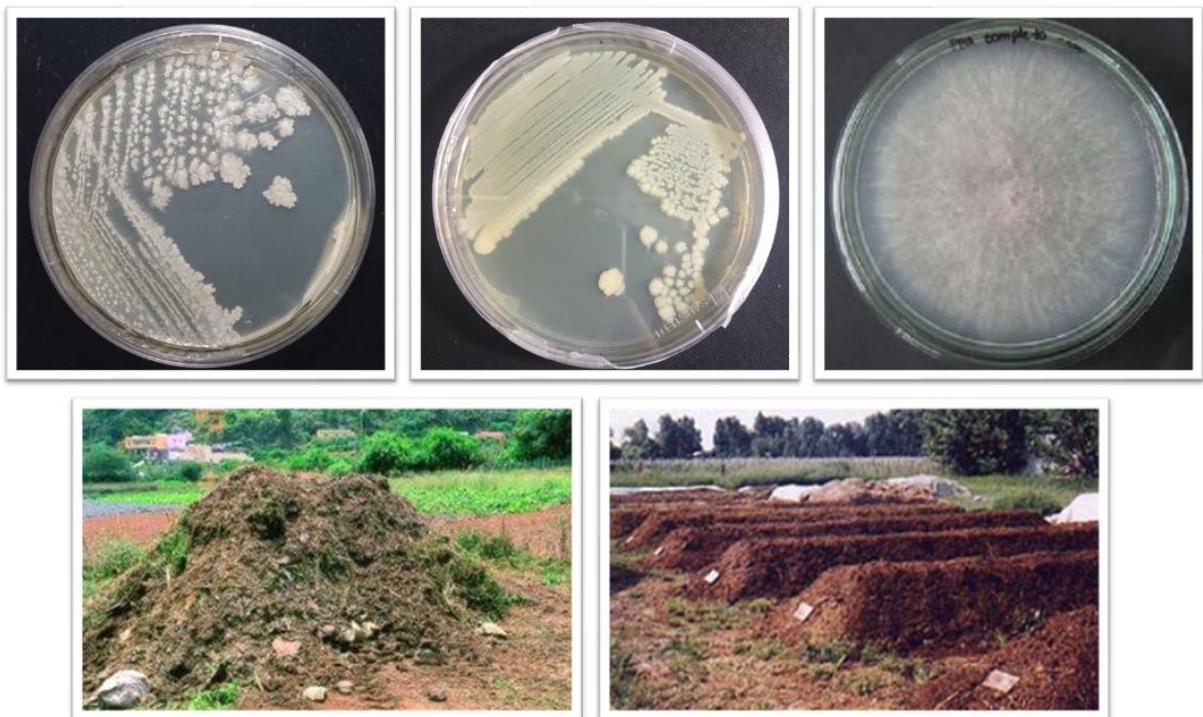


# APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS LIGNOCELULOLÍTICOS COMO TRATAMIENTO PREVIO AL PROCESO DE COMPOSTAJE DE RESTOS VEGETALES



**Trabajo Fin de Máster**

**Universidad de Almería y Universidad de Córdoba**

<b>Autora</b>	María Martínez Maqueda
<b>Titulación</b>	Máster en Bioeconomía Circular y Sostenibilidad
<b>Directora</b>	María Josefa López López
<b>Codirectora</b>	Francisca Suárez Estrella
<b>Departamento</b>	Biología y Geología

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todo el Área de Microbiología de la Universidad de Almería su acogida, y que, de nuevo, me hayan permitido trabajar con ellos. En primer lugar, quiero nombrar, por supuesto, al profesor Joaquín Moreno, quien me hizo ver lo increíble que es la microbiología y hacer que cada vez me guste más. Quiero hacer mención especial a mi tutora, María José López López, y mi cotutora, Paqui Suárez Estrella, ya que en todo momento he contado con su apoyo, confianza y dedicación durante el desarrollo del presente trabajo. Darle las gracias también a Jesús, quien me ha guiado durante todo el ensayo y a quien he dado muchos quebraderos de cabeza con los cortes de luz del digestor, sacar las muestras de la estufa y estar pendiente de la MUFLA, aunque al final siempre ha encontrado soluciones a los problemas. Por supuesto no me puedo olvidar de Macarena (a quien le tengo un cariño especial) y Juan (con su incansable positivismo), quienes siempre han estado ahí desinteresadamente dispuestos a ayudar en lo que hiciese falta. También mencionar a María Rosa, Ana Toribio y María José Estrella (quien me ha ayudado mucho con el respirómetro).

No me puedo olvidar de los compañeros con los que he tenido la oportunidad de trabajar en el laboratorio, sobre todo de Nataly, ya que hemos estado mano a mano trabajando durante todo el ensayo. Nos hemos reído mucho, aunque también nos hemos agobiado juntas. Siempre recordaré con cariño las excursiones a la caseta donde teníamos las muestras para hacer los volteos.

Gracias a Celia, porque sin ella este máster no habría sido lo mismo. Es un honor compartir con una amiga la misma pasión por la ciencia y después de tantos años, sé que nos vamos a tener la una a la otra para lo que necesitemos.

Por último, agradecer a mis padres y familia su apoyo incondicional en todas mis decisiones y todos los consejos que me dan día a día. Gracias por alegraros de cada logro incluso más que yo y por haberme ayudado a llegar donde estoy hoy.

Siempre recordaré el laboratorio de Microbiología como mi segunda casa. Espero volver más pronto que tarde,

María.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Problemática asociada a la generación de residuos agrícolas</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Alternativas sostenibles para la gestión de residuos agrícolas</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.1. Digestión anaeróbica</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2. Vertedero con captura de gas</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.3. Compostaje</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3. Bioconversión de biomasa lignocelulósica durante el compostaje</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4. Aplicación de inoculantes microbianos en compostaje</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5. Tratamiento biológico de residuos orgánicos con microorganismos lignocelulolíticos</b> .....	<b>12</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Material vegetal</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Microorganismos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3. Medios de cultivo y reactivos</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4. Fases Experimentales</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5. Acondicionamiento del material vegetal de partida</b> .....	<b>20</b>
<b>3.6. Preparación del inóculo, inoculación y condiciones de incubación</b> .....	<b>21</b>
<b>3.7. Parámetros de seguimiento</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7.1. Humedad, Materia Orgánica y Cenizas</b> .....	<b>23</b>

3.7.2. Relación C/N .....	24
3.7.3. Análisis respirométrico: Índice Respirométrico Acumulado (AT <sub>4</sub> ).....	25
3.7.4. Análisis de fibras: contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina y tasas de degradación	27
3.8. Análisis estadístico .....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Humedad .....	29
4.2. Materia orgánica y cenizas .....	31
4.3. Relación C/N .....	34
4.4. Análisis Respirométrico .....	36
4.5. Análisis de Fibras .....	37
4.5.1. Porcentaje de hemicelulosa y tasa de biodegradación .....	38
4.5.2. Porcentaje de celulosa y tasa de biodegradación.....	39
4.5.3. Porcentaje de lignina y tasa de biodegradación .....	41
5. CONCLUSIONES .....	45
6. FINANCIACIÓN .....	45
7. BIBLIOGRAFÍA .....	46

## RESUMEN

Actualmente, el compostaje es considerado uno de los tratamientos más efectivos y rentables para gestionar los residuos vegetales procedentes de la agricultura intensiva y transformarlos en compost, un producto de alto valor añadido. Los microorganismos juegan un papel crucial en este proceso ya que impulsan la degradación de la materia orgánica gracias a su versatilidad enzimática. Sin embargo, la estructura de la lignocelulosa supone un gran reto para la microbiota que habita en una pila de compost, lo que puede afectar negativamente a la eficacia del proceso, dando lugar a tiempos de compostaje excesivamente largos, e incluso a productos de mala calidad. De este modo, el objetivo principal que se plantea en este trabajo es la aplicación de microorganismos lignocelulolíticos para promover la biodegradabilidad de los residuos lignocelulósicos, como tratamiento previo al proceso de compostaje.

En este trabajo se utilizó 1 cepa fúngica (*Fusarium oxysporum* 4535) y 2 cepas bacterianas (*Bacillus safensis* 190 y *Bacillus licheniformis* 1974), aisladas previamente de procesos de compostaje de restos vegetales y seleccionadas por su capacidad lignocelulolítica comprobada *in vitro*. El material de partida estuvo compuesto por restos de plantas de tomate y restos de poda mezclados en una proporción (50:50 v/v), cuya humedad fue ajustada en torno al 65%. Una vez acondicionados los materiales de partida, se distribuyeron en bandejas de 30 x 60 cm con tapadera y se inoculó la mezcla de residuos con el hongo de forma independiente, o bien con el consorcio formado por las tres cepas previamente seleccionadas. Las dosis de inóculo fueron descritas como dosis alta ( $10^6$  UFC/g de residuo) y baja ( $10^4$  UFC/g de residuo), estableciéndose posteriormente muestreos a los 10 y 30 días después del inicio del tratamiento. Para determinar la capacidad de ambos tratamientos de activar la biodegradación de las mezclas se evaluaron los siguientes parámetros: humedad, materia orgánica, cenizas, relación C/N, índice respirométrico acumulado a 4 días ( $AT_4$ ) y tasas de degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina, a lo largo de los 30 días que duró el ensayo.

Los resultados mostraron que la inoculación de las muestras con el Consorcio microbiano dio lugar a un notable, aunque no excesivo, descenso de la materia orgánica y de la relación C/N transcurridos 10 días desde el inicio del tratamiento. Así mismo, la aplicación del Consorcio a dosis bajas dio lugar a tasas de degradación de hemicelulosa y celulosa más elevadas, después de 10 días de tratamiento, en comparación con lo observado tras la aplicación del hongo en cultivo puro o de los controles no tratados. Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la aplicación de tratamientos biológicos en residuos orgánicos de origen vegetal resulta una estrategia válida y de enorme interés a la hora de establecer protocolos de bioactivación de residuos lignocelulósicos de forma previa al proceso de compostaje.

**Palabras clave:** Restos vegetales, compostaje, tratamiento biológico, microorganismos lignocelulolíticos, biomasa lignocelulósica, inoculante microbiano.

## ABSTRACT

Composting is currently considered one of the most efficient and cost-effective treatments for managing plant residues from intensive agriculture and transforming them into compost, a high value-added product. Microorganisms play a crucial role in this process, as they drive the degradation of organic matter thanks to their enzymatic versatility. However, the structure of lignocellulose poses a great challenge to the microbiota inhabiting a compost pile, which can negatively affect the efficiency of the process, leading to excessively long composting times and even low-quality products. Therefore, the main objective of this work is the application of lignocellulolytic microorganisms to promote the biodegradability of lignocellulosic wastes, as a pretreatment prior to the composting process.

In this work, 1 fungal strain (*Fusarium oxysporum* 4535) and 2 bacterial strains (*Bacillus safensis* 190 and *Bacillus licheniformis* 1974), previously isolated from vegetable waste composting processes and selected for their lignocellulolytic capacity demonstrated in vitro, were used. The starting material was composed of tomato plant remains and pruning remains mixed in a ratio (50:50 v/v), whose humidity was adjusted to around 65%. Once the starting materials were conditioned, they were distributed in 30 x 60 cm trays with lids. The waste mixture was inoculated with the fungus independently or with the consortium formed by the three previously selected strains. The inoculum doses were described as high dose ( $10^6$  CFU/g of waste) and low dose ( $10^4$  CFU/g of waste), and sampling was established at 10 and 30 days after treatment initiation. To determine the ability of both treatments to activate the biodegradation of the mixtures, the following parameters were evaluated: moisture, organic matter, ash, C/N ratio, 4-day cumulative respirometric index ( $AT_4$ ) and degradation rates of cellulose, hemicellulose and lignin, over the 30 days.

The results showed that inoculation of the samples with the microbial consortium resulted in a significant, but not excessive, decrease in organic matter and C/N ratio after 10 days from the start of treatment. Also, application of the consortium at low doses resulted in higher rates of hemicellulose and cellulose degradation after 10 days of treatment compared to that observed after application of the fungus in pure culture or untreated controls. Therefore, in view of the results obtained in this work, it can be concluded that the application of biological treatments on organic waste of plant origin is a valid strategy and of great interest when establishing protocols for bioactivation of lignocellulosic waste prior to the composting process.

**Keywords:** Crop residues, composting, biological treatment, lignocellulolytic microorganisms, lignocellulosic biomass, microbial inoculant.



Una de las soluciones que se plantea ante esta situación es el uso de sistemas agrícolas intensivos con el fin de satisfacer las necesidades actuales (Aznar-Sánchez *et al.*, 2020). Para que la agricultura intensiva sea sostenible, tiene que recoger los principios de la economía circular, que van desde la producción inicial, pasando por el consumo final, hasta la gestión de los residuos de manera adecuada y eficiente. Por ello, se prioriza cerrar el ciclo mediante la valorización de materiales y productos, y prolongar su vida al incorporar los residuos al proceso productivo (Duque-Acevedo *et al.*, 2020). Sin embargo, tales prácticas generan elevadas cantidades de residuos vegetales, la mayoría de los cuales no se gestionan de manera adecuada, o no se utilizan como materia prima para otros procesos, por lo que la mayor parte de estos residuos se eliminan en vertederos (Baudoin *et al.*, 2013).

Los residuos agrícolas incluyen aquella fracción de los cultivos que no forma parte de la cosecha (Tabla 1) y que, por tanto, no se pueden aprovechar desde un punto de vista comercial. Por ello, están incluidos dentro de esta categoría tallos, raíces, hojas y frutos no aprovechables, los cuales se pueden incorporar al suelo tras ser sometidos a diferentes tratamientos de valorización (López y Boluda, 2011).

**Tabla 1.** Clasificación de los residuos agrícolas (Álvarez Hernández, 2013).

CNAE*	LER**	Descripción	Ejemplos
0111 Cultivos de cereales y otros	0201303	Residuos de la agricultura, horticultura, acuicultura, silvicultura, caza y pesca: Residuos de tejidos vegetales	Pajas Tallo Cascarillas
0112 Cultivo de hortalizas, especialidades de horticultura y productos de vivero	0201303	Residuos de la agricultura, horticultura, acuicultura, silvicultura, caza y pesca: Residuos de tejidos vegetales	Plantas verdes Tallos Restos de poda
0113 Cultivo de frutos, frutos secos, especias y cultivos para bebidas	0201303	Residuos de la agricultura, horticultura, acuicultura, silvicultura, caza y pesca: Residuos de tejidos vegetales	Plantas verdes Tallos Restos de poda
0114 Silvicultura y explotación forestal	0201307	Residuos de la agricultura, horticultura, acuicultura, silvicultura, caza y pesca: Residuos forestales	Pies no maderables Ramas Matorrales

\*CNAE: Clasificación Nacional de Actividades Económicas \*\*LER: Lista Europea de Residuos

La cantidad de residuos agrícolas que se generan a nivel mundial se encuentra en aumento, alcanzando cifras de 2.445,2 millones de toneladas por año, siendo el 42,5% de éstos producidos en China (Fu *et al.*, 2021). Durante el año 2018 en España, se generaron en torno a 744.000 toneladas de residuos vegetales alimentarios (Instituto Nacional de Estadística, 2022). En el caso del modelo de agricultura intensiva Almeriense, se estima que se generan en torno a 1,5 millones de toneladas de

residuos orgánicos procedentes de invernadero, de los cuales, aproximadamente el 50% derivan del cultivo de tomate y pimiento (Duque-Acevedo et al., 2020).

Este constante incremento en la generación de residuos agrícolas ha provocado que los agricultores tengan que adoptar una serie de prácticas de gestión inadecuadas de los residuos agrícolas que, en muchos casos, pueden provocar un desequilibrio ecológico en el agroecosistema (Venkatramanan *et al.*, 2021). Una de las prácticas habituales durante décadas ha sido la quema de residuos, la cual tiene un efecto negativo sobre el suelo, el medio ambiente y la salud humana (Lin y Begho, 2021). Esta práctica se realiza como método rápido de eliminación de restos agrícolas, aunque no debe considerarse una estrategia sostenible (Raza *et al.*, 2022).

Los principales efectos adversos de la quema de residuos son la emisión de gases de efecto invernadero, el aumento de los niveles de partículas y el *smog*, fenómeno atmosférico no natural que provoca una niebla artificial formada por la contaminación del aire derivada de la actividad humana, o por fenómenos naturales como la neblina o la ausencia de viento (Stanaszek-Tomal, 2021). Tales fenómenos provocan problemas de salud, deterioro de la fertilidad del suelo y pérdida de la biodiversidad de los suelos agrícolas. Además, se incrementa de manera significativa la cantidad de contaminantes atmosféricos como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), amoníaco (NH<sub>3</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), hidrocarburos no metánicos (NMHC), compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y compuestos orgánicos semivolátiles (SVOCs). Todo ello acompañado, además, de la pérdida importante de carbono orgánico, nitrógeno y otros nutrientes que, gestionados de otro modo más sostenible, podrían ser aportados al suelo (Bhuvaneshwari *et al.*, 2019).

Por otra parte, el abandono de los residuos en vertederos no controlados puede causar también una considerable contaminación del aire, del suelo, de las aguas superficiales y subterráneas, así como la destrucción del entorno ecológico, y un importante riesgo de explosión (Intharathirat y Salam, 2016). Este tipo de vertederos es uno de los principales contribuyentes de emisiones de dióxido de carbono y metano (Daugela *et al.*, 2021), las cuales dependen del tipo y cantidad de residuos depositados en él, de la antigüedad y de las condiciones climáticas que se den en el propio vertedero (Njoku *et al.*, 2019). Asimismo, se plantean diversos riesgos de salud resultantes de la emisión y liberación de agentes químicos y biológicos peligrosos, del tipo de exposición a estos agentes y de la susceptibilidad de las poblaciones expuestas a ellos (Vimercati *et al.*, 2016).

Teniendo todo esto en cuenta, queda justificada la búsqueda y aplicación de otras opciones de gestión de residuos agrícolas, más respetuosas con el medio ambiente, la salud humana y el suelo, y que permitan revalorizar un material que posee excelentes características nutricionales y energéticas.

## **1.2. Alternativas sostenibles para la gestión de residuos agrícolas**

La gestión de los residuos agrícolas ha cobrado gran importancia ya que, mientras que su ineficiente manejo desencadena efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud, la correcta

gestión de los mismos hace que se puedan obtener nuevos productos de un alto valor añadido (Chang y Li, 2019). Por ello, los sistemas que permiten la conversión de residuos en energía (Figura 2) son una estrategia prometedora (Nordahl *et al.*, 2020).

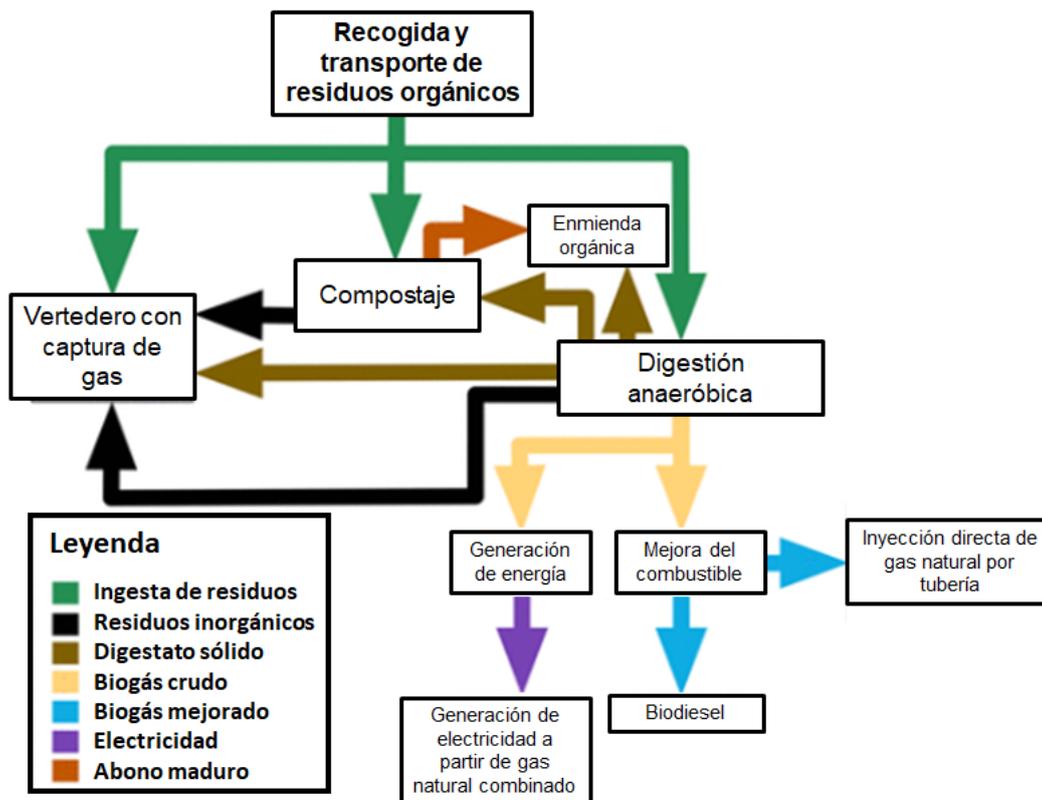


Figura 2. Sistemas de conversión de residuos en energía (modificado de Nordahl *et al.*, 2020).

### 1.2.1. Digestión anaeróbica

En Europa la tecnología de digestión anaeróbica (DA) está muy presente, ya que permite la bioconversión de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, obteniéndose biogás para la producción de electricidad o biometano (gas natural renovable), así como un subproducto renovable denominado digestato (Battista *et al.*, 2019).

El biogás, es uno de los productos principales resultantes de la digestión anaeróbica y se considera un recurso energético verde renovable. Se trata de una mezcla de gases, de composición variable, dependiente de los sustratos y de las condiciones en las que se produce la digestión anaeróbica. La mezcla de biogás la componen principalmente: metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), dioxígeno (O<sub>2</sub>), dinitrógeno (N<sub>2</sub>), ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) y otros compuestos gaseosos minoritarios. De todos ellos, el metano es el más importante al tener la mayor densidad energética, por lo que es de gran interés que el biogás tenga un alto contenido en este compuesto. Otro subproducto que se obtiene de la digestión anaeróbica es el digestato. Este puede ser sólido o líquido y contiene cantidades importantes de nitrógeno, macronutrientes y micronutrientes (Ngan *et al.*, 2020). Entre los usos del

digestato está su aporte como solución nutritiva en los cultivos, favoreciendo así un sistema circular en la producción de alimentos, ya que el uso de fertilizantes de base biológica supone una ventaja en comparación con el uso tradicional de fertilizantes minerales (Sodergren *et al.*, 2022).

### **1.2.2. Vertedero con captura de gas**

El gas de vertedero se compone principalmente de metano y dióxido de carbono y su recuperación es conveniente para una mejor utilización de los residuos, ya que de este modo se reducen las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera. Alguno de los usos del gas de vertedero son la comercialización de biometano, generación de electricidad, evaporación de lixiviados, calefacción, generación de vapor y producción de derivados químicos/bioquímicos (Brigagao *et al.*, 2021). Este biogás se genera por la acción de los microorganismos anaeróbicos al descomponer los compuestos orgánicos contenidos en los residuos. Para mejorar la calidad y el valor calorífico del gas de vertedero es necesario eliminar el dióxido de carbono, de manera que el biometano restante se puede utilizar como energía renovable (Xie *et al.*, 2022). La recuperación de energía a partir de la captura y la utilización del biogás permite generar ingresos económicos a partir de un producto considerado residuo y, además, esta práctica permite controlar las emisiones de metano derivadas a la atmósfera (Coskuner *et al.*, 2020).

Sin embargo, además del biogás, los productos en descomposición de la materia orgánica que se encuentran en los residuos, dan lugar a la formación de lixiviados, que pueden migrar a los acuíferos por falta de protección adecuada en los vertederos (Dabrowska y Rykala, 2021). Un nivel elevado de lixiviados no solo es responsable de algunos de los deslizamientos de tierra ocasionados en los vertederos, sino que aumenta el potencial de fuga, con la consiguiente contaminación de las aguas subterráneas. Por ello, el sistema de recolección de lixiviados en vertederos es uno de los desafíos actuales relacionados con la gestión de residuos mediante esta estrategia (Liu y Liu, 2021).

### **1.2.3. Compostaje**

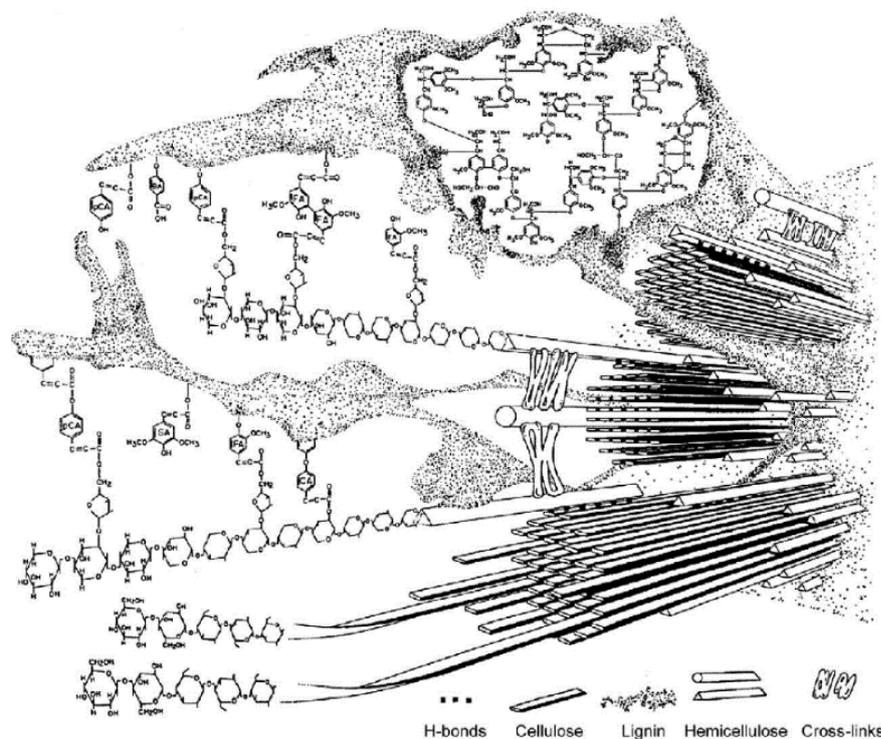
Entre las ventajas directas del compostaje como método de gestión de residuos se encuentra la producción de compost, enmienda húmica orgánica, que reduce la dependencia de pesticidas y fertilizantes sintéticos (Palaniveloo *et al.*, 2020). De forma indirecta, fomentar la práctica del compostaje puede ayudar a reducir la producción de gas metano de los vertederos, minimizando así la producción de gases invernadero.

La biotransformación aeróbica de la materia orgánica durante un proceso de compostaje provoca variaciones importantes de la temperatura en el interior de la pila de residuos. Dicho fenómeno está directamente relacionado con la actividad de las distintas poblaciones microbianas que protagonizan las fases del proceso de compostaje (Díaz Bolívar, 2021). Por su especial interés en términos de

economía circular, se describen a continuación los aspectos más relevantes relativos al compostaje de residuos agrícolas.

### 1.3. Bioconversión de biomasa lignocelulósica durante el compostaje

La biomasa lignocelulósica (Figura 3) se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Además contiene pectinas, proteínas, y otros materiales nitrogenados (Bhuvaneshwari *et al.*, 2019).

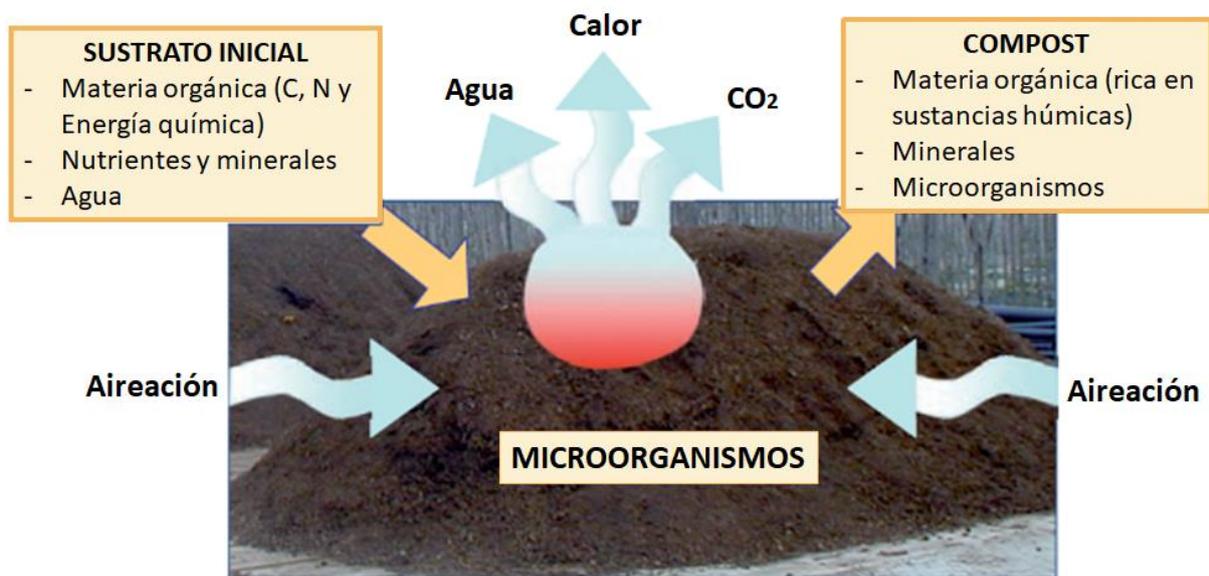


**Figura 3.** Representación esquemática de la pared secundaria de la célula vegetal mostrando cadenas lineales de celulosa y hemicelulosas ramificadas inmersas en la matriz de lignina (Marques, 2010).

La celulosa es un biopolímero compuesto por unidades de glucosa monomérica unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, en forma de microfibrillas alineadas en paralelo, y unidas por puentes de hidrógeno. La hemicelulosa tiene una composición más compleja, ya que está formada por un grupo heterogéneo de polisacáridos que incluyen D- xilosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa y ácido 4-O-metil-D-glucurónico, los cuales se unen fuertemente a las microfibrillas de celulosa mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Por su parte, la lignina es un polímero fenólico complejo y recalcitrante que está formado por la reticulación de tres componentes principales: p-cumarílico, coniferílico y sinapílico. Así, en las paredes celulares vegetales, la celulosa se encuentra incrustada en una matriz de hemicelulosa y lignina, formando una estructura tridimensional muy compleja y estable

(Fu *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021). No obstante, a pesar de la complejidad mostrada por la biomasa lignocelulósica, la degradación de la misma es posible gracias a la acción de algunos microorganismos que cuentan con las enzimas necesarias para su transformación.

Durante el compostaje, la materia orgánica se degrada de forma constante, estando dicho proceso condicionado por diversos parámetros como la temperatura, la humedad, el oxígeno disponible o el pH, entre otros. De este modo, en un proceso de compostaje (Figura 4), el control adecuado de dichos parámetros puede favorecer que los microorganismos desarrollen sus actividades biológicas de manera óptima (Moreno *et al.*, 2013).



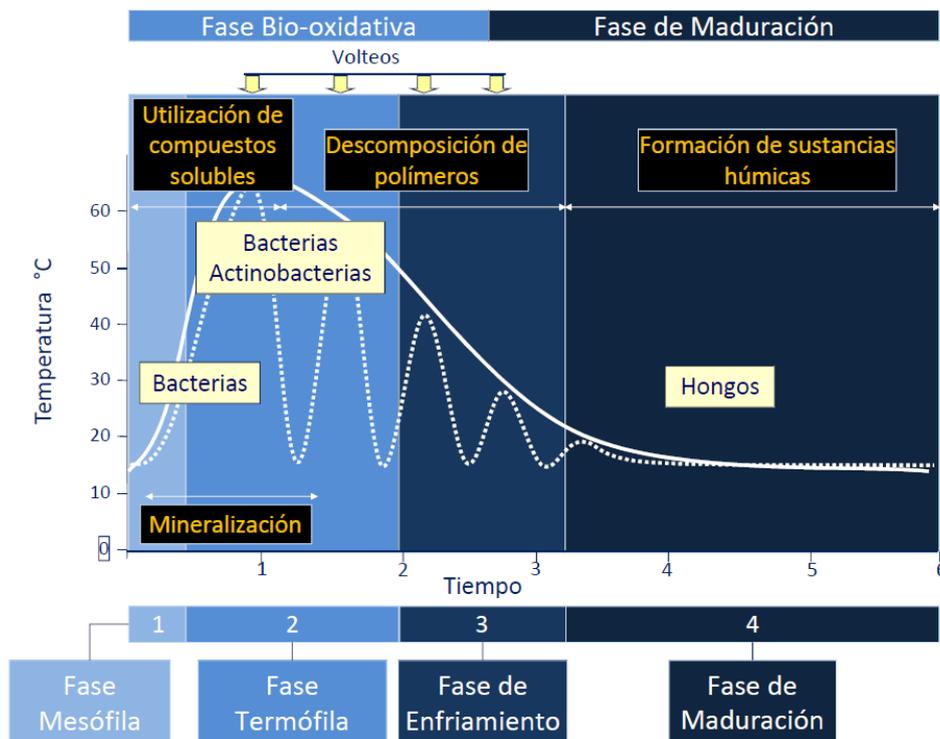
**Figura 4.** Esquema general de una pila de compostaje (modificado de Moreno y Moral, 2008).

Así mismo, la calidad del compost va a depender de diferentes factores, estando determinada por los materiales de partida, las proporciones en las que se mezclan y la forma en la que son procesados. Al inicio de un proceso de compostaje, los materiales deben tener una relación C/N de entre 25 y 30 y un porcentaje de humedad en torno al 60%. Cuando las mezclas son apropiadas se crea un entorno favorable para el crecimiento de la microbiota aeróbica del suelo (Pena *et al.*, 2020). Otro parámetro importante es la concentración de oxígeno, que influye directamente sobre la actividad microbiana y el tipo de especies presentes, además de influir en la temperatura del proceso. Cuando el nivel de oxígeno es suficiente, la temperatura del compost aumenta rápidamente, mientras que, si el suministro de oxígeno es insuficiente, se produce una reducción en las tasas de degradación de la materia orgánica. Un eficiente aporte de oxígeno permite acelerar la estabilidad y el grado de maduración del compost, mientras que, si el aporte es ineficiente, puede derivar en inestabilidad y toxicidad (Zheng *et al.*, 2018).

Además, este proceso está protagonizado por una enorme diversidad de grupos microbianos, principalmente bacterias y hongos mesófilos y termófilos, muchos de ellos directamente relacionados con la degradación de la biomasa lignocelulósica. Las bacterias son el grupo dominante durante el proceso de transformación gracias a su tolerancia térmica, mientras que los hongos juegan un papel más importante en etapas más avanzadas del proceso. El potencial enzimático de muchos de estos hongos les permite biotransformar moléculas más recalcitrantes, difíciles de degradar por otros microorganismos (Biyada *et al.*, 2021).

El compostaje consta de cuatro fases principales (Figura 5), microbiológicamente diferentes, que se clasifican en función de la temperatura (Solowiej *et al.*, 2021):

- Fase mesófila
- Fase termófila
- Fase de enfriamiento
- Fase de maduración



**Figura 5.** Fases del proceso de compostaje (adaptado de Moreno y Mormeneo, 2011).

La **fase mesófila** (10 - 42 °C) es la más dinámica, se incrementa rápidamente la temperatura, el pH sufre amplias variaciones y se inicia la descomposición de los compuestos orgánicos más simples. Al inicio del proceso, los sustratos se encuentran a temperatura ambiente y las bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes comienzan a actuar sobre ellos, utilizando las sustancias carbonadas solubles y de fácil degradación, como los azúcares y los aminoácidos. Esto provoca la formación de

ácidos orgánicos y como resultado el pH disminuye. Las bacterias oxidativas y fermentativas son las mayoritarias durante esta fase, ya que crecen rápidamente gracias a los compuestos fácilmente degradables. El incremento de la temperatura debido a la actividad metabólica de los microorganismos durante esta fase ocasiona la transición de una microbiota mesófila a termófila, al alcanzarse temperaturas entre 42 - 45 °C.

Por otra parte, la **fase termófila** (45 - 70 °C) se caracteriza por las temperaturas elevadas y prolongadas, resultado de la intensa actividad metabólica de origen microbiano. Los picos de temperatura máxima pueden darse de forma repetitiva por la acción de los volteos o la oxigenación forzada de las pilas, lo que favorece el efecto higienizante del proceso de compostaje. Durante esta fase proliferan microorganismos termotolerantes y termófilos, siendo los microorganismos no termotolerantes (incluyendo patógenos y parásitos) inhibidos o eliminados. Mohos y levaduras son eliminados completamente a partir de los 60 °C. Durante esta fase se comienzan a metabolizar compuestos más complejos como proteínas, liberándose así, nuevas sustancias monoméricas simples que son utilizadas por los microorganismos. Las tasas de degradación en comparación con la fase anterior son más elevadas.

La **fase de enfriamiento** comienza cuando la fuente de carbono se convierte en un factor limitante. Durante esta fase de enfriamiento la temperatura comienza a disminuir gradualmente, de forma que tras los volteos ya no se detectan incrementos importantes de la misma, alcanzándose finalmente los valores de temperatura ambiental. Por último, en la **fase de maduración**, tanto la materia orgánica como la producción de calor se estabilizan. Estas dos últimas etapas se caracterizan por el crecimiento de microorganismos mesófilos similares a los de la primera fase. Se produce la degradación de compuestos complejos, y se espera un incremento en las tasas de degradación de la fracción de lignina. Según avanza la maduración, la comunidad microbiana se hace más estable (Moreno y Moral, 2008; Papale *et al.*, 2021;).

#### 1.4. Aplicación de inoculantes microbianos en compostaje

Los microorganismos juegan un papel clave durante el compostaje. El mecanismo de actuación de éstos en el entorno de la pila se basa en producir un sistema de enzimas extracelulares que permitan impulsar la transformación y degradación de la biomasa lignocelulósica (Wu *et al.*, 2019). Numerosos trabajos defienden que la adición de microorganismos exógenos a la pila de compostaje, mediante técnicas de bioaugmentación, puede mejorar el proceso (Jurado *et al.*, 2014, 2015; Tu *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2022).

Durante el compostaje de restos vegetales, los microorganismos autóctonos degradan los compuestos orgánicos presentes en el material, pero para que se produzca la degradación de forma completa se requiere de un tiempo prolongado. Además, la eficiencia del compostaje puede reducirse si la microbiota presente en los residuos no es lo suficientemente diversa o si los parámetros ambientales le afectan de manera negativa. En esta situación, la inoculación microbiana es una estrategia apropiada que puede activar las fases previas del proceso, acelerar la degradación de las

fracciones más recalcitrantes y promover el grado de humificación, mejorando las propiedades del compost final (Greff *et al.*, 2021). Cabe destacar que la utilización de inóculos a base de consorcios microbianos multifuncionales constituidos por bacterias y hongos puede provocar una notable mejora del proceso y de los productos finales obtenidos (Yu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Cuando la degradación de la materia orgánica no se produce de manera completa, no se puede asegurar la estabilidad del compost final. Además, la aplicación de compost inmaduro puede provocar la inmovilización de nutrientes en el suelo, la inhibición del crecimiento vegetal y la inducción de anaerobiosis en el suelo. Junto con las propiedades físicas y químicas de las materias primas, así como la relación C/N, la humedad, el pH y la tasa de aireación, el uso de inoculantes microbianos, puede resultar de gran utilidad a la hora de mejorar las condiciones de desarrollo del proceso de compostaje y de obtener un compost de mayor calidad (Grgic *et al.*, 2019). No obstante, respecto a la aplicación de inoculantes microbianos durante el proceso de compostaje, es importante determinar cuál es el mejor momento para llevarla a cabo, de forma que se eviten problemas de competencia que afecten a la eficacia del inóculo o del propio proceso (Zhou *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Greff *et al.*, 2021).

### **1.5. Tratamiento biológico de residuos orgánicos con microorganismos lignocelulolíticos**

El uso de microorganismos como tratamiento biológico de residuos lignocelulósicos se considera una técnica respetuosa con el medio ambiente, que requiere un bajo consumo energético, un bajo coste económico y condiciones operativas menos drásticas, en comparación con los tratamientos de carácter físico y químico (Mishra *et al.*, 2018). Dichos tratamientos se utilizan con el fin de superar las barreras físicas y químicas propias de la biomasa lignocelulósica, de forma que esta sufra una degradación parcial o total, y se incremente así la accesibilidad a las diferentes fracciones del polímero (Zhang *et al.*, 2021). En este sentido, el tratamiento biológico de restos vegetales de forma previa al proceso de compostaje puede resultar de enorme interés ya que muchos microorganismos producen enzimas capaces de degradar la lignocelulosa de forma directa o indirectamente, lo que podría repercutir en la eficacia del proceso (Wu *et al.*, 2022). Estas enzimas se clasifican en celulasas, hemicelulasas y ligninasas en función de los polímeros que degradan (Wu *et al.*, 2022).

Existe una gran variedad de microorganismos lignocelulolíticos presentes en el compost, que tienen un papel clave en el ciclo global del carbono al ser la lignocelulosa el principal biopolímero presente en la naturaleza (Vargas-García *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Jurado *et al.*, 2014 se describen algunos de los microorganismos más relevantes que participan durante el compostaje (Tabla 2), y que son predominantes en una o más de las fases térmicas descritas previamente.

Entre los componentes de la biomasa lignocelulósica, la lignina tiene propiedades moleculares y características estructurales que hacen que sea difícil de degradar por parte de los microorganismos. No obstante, se han descrito microorganismos con un sistema enzimático específico capaces de degradar la lignina, involucrando enzimas de tipo lignina peroxidasas, lacasas y peroxidasas dependientes de manganeso, así como oxidasas productoras de hidrógeno (López *et al.*, 2007). Por

otra parte, la celulosa y la hemicelulosa, pueden ser degradadas por un amplio grupo de enzimas. Las celulasas, son las responsables de la hidrólisis de la celulosa, e hidrolizan los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, de la molécula: por otra parte, las xilanasas son responsables de la hidrólisis de la hemicelulosa, ya que participan en la degradación del xilano, el carbohidrato principal que se encuentra en el polímero de hemicelulosa (Wei *et al.*, 2019).

**Tabla 2.** Algunos géneros microbianos implicados en el proceso de compostaje y fase predominante en la que participan (Modificado de Jurado *et al.*, 2014 y Ryckeboer *et al.*, 2003).

GÉNEROS	TIPO	FASE PREDOMINANTE (*)
<i>Arthrobacter sp.</i>	Bacteria gram +	MES
<i>Brachybacterium sp.</i>	Bacteria gram +	MES, TER, ENF
<i>Corynebacterium sp.</i>	Bacteria gram +	MES
<i>Microbacterium sp.</i>	Bacteria gram +	MES y TER
<i>Bacillus sp.</i>	Bacteria gram +	MES y TER
<i>Brevibacterium sp.</i>	Bacteria gram +	MES, TER, ENF y MAD
<i>Ureibacillus sp.</i>	Bacteria gram -	TER
<i>Chelatococcus sp.</i>	Bacteria gram -	MES, TER y ENF
<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	Bacteria gram -	MES, TER y ENF
<i>Cellulosimicrobium sp.</i>	Bacteria gram +	TER
<i>Streptomyces sp.</i>	Bacteria gram +	TER y MES
<i>Brevibacillus sp.</i>	Bacteria gram +	TER y MES
<i>Pseudomonas sp.</i>	Bacteria gram -	MES
<i>Aspergillus sp.</i>	Hongo	MES
<i>Candida sp.</i>	Hongo	MES y TER
<i>Cladosporium sp.</i>	Hongo	MES
<i>Gibellulopsis sp.</i>	Hongo	MES, TER, ENF y MAD
<i>Ochrocladosporium sp.</i>	Hongo	MES y ENF
<i>Plectosphaerella sp.</i>	Hongo	MES, TER y ENF
<i>Scopulariopsis sp.</i>	Hongo	MES
<i>Acremonium sp.</i>	Hongo	MES
<i>Alternaria sp.</i>	Hongo	MES
<i>Penicillium sp.</i>	Hongo	MES
<i>Fusarium sp.</i>	Hongo	MES
<i>Nakazawea sp.</i>	Hongo	MES
<i>Plectosphaerella sp.</i>	Hongo	TER
<i>Pyrenochaeta sp.</i>	Hongo	MES

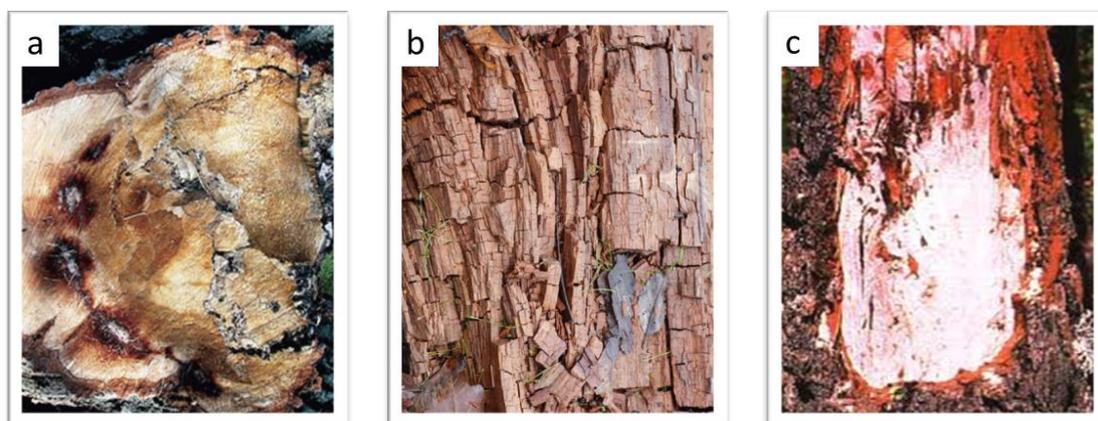
\*Fases del compostaje: MES, mesófila; TER, termófila; ENF, enfriamiento; MAD, maduración.

La actividad microbiana es más intensa al inicio del proceso de compostaje, durante la fase bio-oxidativa, que comprende las etapas mesófila y termófila (Figura 5). Durante esta fase se produce

una intensa proliferación de la microbiota y una elevada tasa de degradación. Además, se incrementa el recuento de microorganismos termófilos y se inhiben o eliminan los organismos no termotolerantes. Aun así, la presencia de microorganismos termotolerantes durante todo el proceso de compostaje, y no sólo en etapas termófilas, ya ha sido demostrada previamente por López *et al.* (2021). En la fase de maduración, la actividad microbiana disminuye y comienza el proceso de humificación (Villar *et al.*, 2016).

Las Actinobacterias son un grupo ampliamente representado durante el proceso de compostaje y se consideran un buen indicador de biotransformación de la materia orgánica. Este grupo se suele asociar con la etapa final del proceso, debido a su baja tasa de crecimiento y a su capacidad para degradar las sustancias más recalcitrantes. Entre los géneros de actinobacterias termotolerantes presentes en procesos de compostaje destacan *Microbacterium*, *Brevibacterium* y *Rhodococcus* (Moreno *et al.*, 2021). En relación al Filo bacteriano Firmicutes, los géneros más representativos del proceso por carácter termotolerante son *Bacillus*, *Brevibacterium* y *Ureibacillus*. En concreto, el género *Bacillus*, es capaz de sobrevivir en la pila de compostaje al tener la capacidad de formar endosporas. Destacan las especies *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thermoamylovorans* (Jurado *et al.*, 2014).

Sin embargo, a pesar de que durante el proceso de compostaje de restos vegetales predominan los procariotas, muchos hongos presentes en distintas fases del proceso destacan como agentes degradadores de lignocelulosa. Las estrategias fúngicas para degradar la biomasa lignocelulósica son muy complejas debido a la estructura tridimensional de la lignocelulosa. Los hongos filamentosos tienen un papel importante al degradar la pared celular de la célula vegetal, siendo los principales responsables los hongos que degradan la madera. Éstos descomponen y asimilan los polímeros orgánicos muy recalcitrantes gracias a grandes conjuntos de enzimas que liberan al medio ambiente durante su crecimiento. Se han descrito tres grupos de hongos (Figura 6) con diferentes mecanismos para degradar la lignocelulosa: hongos de la podredumbre blanda, hongos de la podredumbre parda y hongos de la podredumbre blanca (Andlar *et al.*, 2018).



**Figura 6.** Hongos de la podredumbre: (a) hongo de la podredumbre blanda, (b) hongo de la podredumbre parda y (c) hongo de la podredumbre blanca.

La mayoría de los hongos de la pudrición blanda son ascomicetos y atacan principalmente a los materiales que presentan un mayor contenido de humedad y un menor contenido en lignina, provocando el ablandamiento y oscurecimiento de los tejidos. Destacan los géneros *Aspergillus* y *Neurospora* en este tipo de hongos (Sánchez, 2009; Andlar *et al.*, 2018). Los hongos de la podredumbre parda son basidiomicetos que a medida que van degradando la madera, hacen que ésta se oscurezca y se vuelva marrón debido a la acumulación de residuos de lignina modificada, resultante de la eliminación de la fracción de holocelulosa. En este grupo destacan cepas identificadas como *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Coniophora puteana* (Arantes y Goodell, 2014). Por último, los hongos de la pudrición blanca son los únicos capaces de degradar la lignina a dióxido de carbono y agua. Algunos de los hongos de la pudrición blanca capaces de causar la deslignificación selectiva de la madera se han identificado como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete carnososa*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Botrytis cinerea*, *Stropharia coronilla* y *Trametes versicolor* (Andlar *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la problemática actual en cuanto a la ineficiente gestión de los residuos agrícolas y, por ende, el perjuicio que este hecho supone para el medio ambiente, es necesario buscar alternativas que permitan la correcta gestión y tratamiento de los mismos, y que no comprometan la salud del entorno físico y humano. Una de las estrategias más prometedoras y viables desde un punto de vista sostenible es el compostaje. Sin embargo, la obtención de un compost de calidad puede suponer un tiempo de espera de entre 5 meses y 1 año, en función de las materias primas, el tamaño de las pilas y el control adecuado del proceso. Sería por tanto de enorme interés, poder acortar los tiempos de procesado sin sacrificar por ello la calidad de los productos finales.

Por tanto, teniendo en cuenta los antecedentes planteados, el Objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster, fue la aplicación de inoculantes microbianos con capacidad lignocelulolítica para mejorar la biodegradabilidad de residuos vegetales en etapas previas al proceso de compostaje de restos vegetales.

En función de este Objetivo principal se establecieron los siguientes Objetivos específicos:

1. Acondicionamiento del material vegetal de forma previa a la aplicación de los inoculantes microbianos y establecimiento del protocolo de inoculación.
2. Evaluación del efecto de la dosis de inóculo y el tiempo de incubación sobre los indicadores respirométricos y la fracción lignocelulósica de los restos vegetales previamente inoculados.
3. Selección de un protocolo de inoculación que permita la activación de la biodegradabilidad de residuos vegetales en fase previas al proceso de compostaje y que acelere la biodegradación de las distintas fracciones lignocelulósicas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Como material vegetal de partida se buscaron diferentes empresas de gestión de residuos vegetales procedentes de la agricultura intensiva, centradas en la recogida y biotransformación de los mismos. Finalmente, el material fue proporcionado por la empresa Reciclados Almerienses 2005, quien facilitó el material fresco y sin fruto, principalmente compuesto por restos de tomate. Una vez recibido el material en el laboratorio, se sometió a un análisis físico-químico revelando los siguientes datos de interés: 75% de humedad, densidad aparente 18 kg/m<sup>3</sup>, 35,5% de carbono y 2,8% de nitrógeno. Además de los residuos vegetales frescos, se utilizaron restos de poda para el acondicionamiento de la mezcla de partida, de forma que fuese lo más similar a la utilizada en un proceso de compostaje. Los restos de poda también fueron analizados en el laboratorio revelando los siguientes datos de interés: 7% de humedad, densidad aparente de 47 kg/m<sup>3</sup>, 29,3% de carbono y 0,8% de nitrógeno.

#### 3.2. Microorganismos

Como inoculantes microbianos se utilizaron tres cepas (un hongo y dos bacterias) (Figura 7) previamente identificadas como *Fusarium oxysporum* cepa 4535 (no patógeno), *Bacillus licheniformis* cepa 1974 y *Bacillus safensis* cepa 190. Estas cepas fueron proporcionadas por el grupo BIO-175 de la Universidad de Almería, siendo el origen de las mismas un proceso de compostaje de residuos vegetales.



**Figura 7.** Microorganismos lignocelulolíticos utilizados durante el estudio.

Las tres cepas fueron seleccionadas en estudios previos por ser termotolerantes y por su capacidad para producir enzimas relacionadas con la degradación de la lignocelulosa, especialmente en el caso del hongo, quién había mostrado una notable actividad xilanasa, celulasa y ligninasa. En este

trabajo, se utilizó como inoculante microbiano el hongo de forma independiente, así como un consorcio de éste con ambas cepas de *Bacillus* spp.

Para la conservación de los microorganismos a corto-medio plazo se cultivaron en medio APHA en el caso de las bacterias, y en Agar Patata Dextrosa para el caso del hongo, y se incubaron a 30 °C durante 24 h y 4 días, respectivamente (en el apartado 3.3., se describen con detalle los medios de cultivos utilizados). Los cultivos microbianos, una vez transcurrido el tiempo de incubación, se almacenaron en la cámara de 4 °C en placas y tubos de agar inclinado hasta el momento de su utilización.

### 3.3. Medios de cultivo y reactivos

Como medio de cultivo general para el cultivo de la cepa fúngica se utilizó medio Agar Patata Dextrosa (PDA, receta comercial, 39 g/L; OXOID, ref. CM0139). Como disolvente se utilizó agua destilada (Tabla 3). Para la elaboración del medio en placas Petri, el medio deshidratado se mezcló en un matraz de vidrio junto con el agua destilada, y se autoclavó la mezcla a 1 atmósfera de sobrepresión, a 121 °C, durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar hasta temperatura de sobrefusión y fue vertido en placas Petri de 90 mm en condiciones de asepsia.

**Tabla 3.** Composición medio PDA por litro de agua destilada.

PDA	
Peptona de patata	4 g/L
Glucosa	20 g/L
Agar	15 g/L
pH	5,6 ± 0,2

Además, para la preparación del cultivo fúngico en medio líquido se utilizó caldo de Soja-Triptona (TSB, receta comercial, 30 g/L; OXOID, ref. CM0129) y como disolvente se utilizó agua destilada (Tabla 4). Para su elaboración se mezcló el medio en un matraz de vidrio con el agua destilada y se autoclavó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

**Tabla 4.** Composición medio TSB por litro de agua destilada.

TSB	
Digerido pancreático de caseína	17 g/L
Digerido enzimático de soja	3 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Fosfato dipotásico	2,5 g/L
Glucosa	2,5 g/L
pH	7,3 ± 0,2

Como medio de cultivo general en placa Petri de las bacterias se utilizó medio agar APHA (Tabla 5) (receta comercial, 23,5 g/L; OXOID, ref. CM0463), y se utilizó como disolvente agua destilada (Tabla 5). Para la elaboración del medio en placa, el medio deshidratado se mezcló en un matraz de vidrio con el agua destilada, y se autoclavó en las mismas condiciones descritas previamente. Una vez alcanzada la temperatura de sobrefusión tras el autoclavado, el medio fue vertido en placas cuadradas de 120 mm de lado, manteniendo las condiciones de asepsia.

**Tabla 5.** Composición medio APHA por litro de agua destilada.

APHA	
Extracto de levadura	2,5 g/L
Digerido enzimático de caseína	5 g/L
Glucosa	1 g/L
Agar	15 g/L
pH	7,0 ± 0,2

La preparación de los cultivos bacterianos en medio líquido se llevó a cabo en Caldo Nutritivo (receta comercial, 8 g/L; Panreac, ref. 413793.1210), utilizando agua destilada como disolvente (Tabla 6). El medio deshidratado se pesó y se disolvió en agua, antes de ser repartido en tubos de ensayo a razón de 5 mL por tubo. Una vez repartido en los tubos, el medio se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar antes del momento de su utilización.

**Tabla 6.** Composición medio Caldo Nutritivo por litro de agua destilada.

CALDO NUTRITIVO	
Extracto de carne	3 g/L
Gelatina de peptona	5 g/L
pH	6,8 ± 0,2

Para el análisis de fibras se prepararon tres reactivos diferentes (Tabla 7) siguiendo el protocolo proporcionado por ANKOM Technology (2016):

**Tabla 7.** Composición de los reactivos empleados para el análisis de fibras.

DETERGENTE NEUTRO (FND)	
Solución Detergente Neutro	Cantidad
Detergente Neutro	59,98 g/L
Trietilenglicol	10 mL/L
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1000 mL
DETERGENTE ÁCIDO (FAD)	
Solución Detergente Ácido	Cantidad
Detergente ácido	20 g/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1N)	1000 mL
ÁCIDO SULFÚRICO (LFAD)	
Solución Ácido sulfúrico	Cantidad
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (24N)	250 mL

Para la preparación de cada uno de los reactivos se procedió de la siguiente forma:

- Detergente Neutro (FND). Se pesaron 119,96 g de Detergente Neutro (ANKOM, ref. FND20C) y, junto con 20 mL de Trietilenglicol, se mezclaron en un bote ISO utilizando como disolvente 2L de agua destilada. A esta solución se le aplicó agitación suave y constante hasta su completa disolución.
- Detergente Ácido (FAD). Se pesaron 40 g de Detergente Ácido (ANKOM, ref. FAD20C) y se mezclaron con 2L de ácido sulfúrico 1N en un bote ISO. El ácido se adicionó con la ayuda de una probeta de vidrio bajo la campana extractora de gases. La solución se colocó en un agitador hasta disolverse completamente.
- Ácido sulfúrico (LFAD). Se prepararon 250 mL de ácido sulfúrico 24N en un vaso de precipitado de vidrio, en el interior de una campana extractora de gases para evitar riesgos de inhalación de gases.

### 3.4. Fases Experimentales

Los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo se dividieron globalmente en tres bloques, tal y como se muestra en la Figura 8. (i) Un primer bloque de trabajo en el que se recogieron las materias primas en la empresa de gestión de residuos, y se acondicionaron de forma previa a su inoculación; posteriormente se prepararon los inóculos de las dos cepas de *Bacillus* spp. y de *Fusarium oxysporum*; (ii) Una vez conocida la densidad celular de los tres inóculos microbianos, tanto el hongo de forma independiente, como el consorcio formado por los tres microorganismos, se aplicaron a las mezclas de residuos acondicionados, a dos dosis diferentes y se incubaron durante un tiempo total de 30 días; (iii) Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras, se evaluó la influencia de la inoculación microbiana mediante el análisis de distintos parámetros físico-químicos y respirométricos.

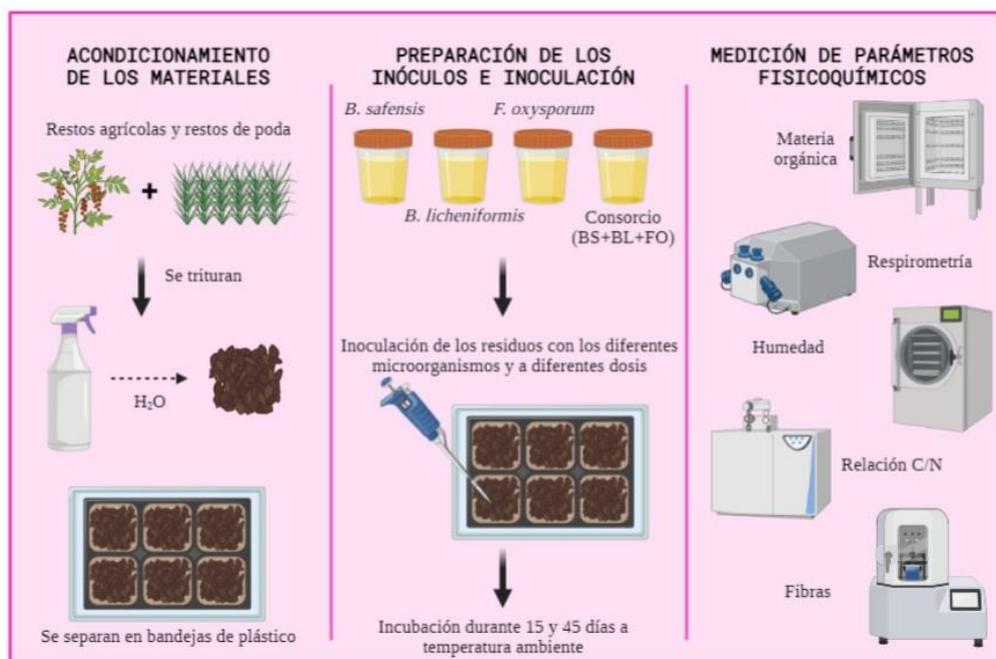


Figura 8. Fases Experimentales que componen el Trabajo Fin de Máster (Elaboración propia utilizando Biorender).

Los factores de variabilidad del ensayo de inoculación fueron los siguientes:

- Pretratamiento: *Fusarium oxysporum*, Consorcio, Control
- Dosis: Alta (1) y Baja (2)
- Tiempo: 0, 10 y 30 días
- Repetición: 3 repeticiones

A continuación, se describe de forma detallada la metodología aplicada en cada bloque experimental.

### 3.5. Acondicionamiento del material vegetal de partida

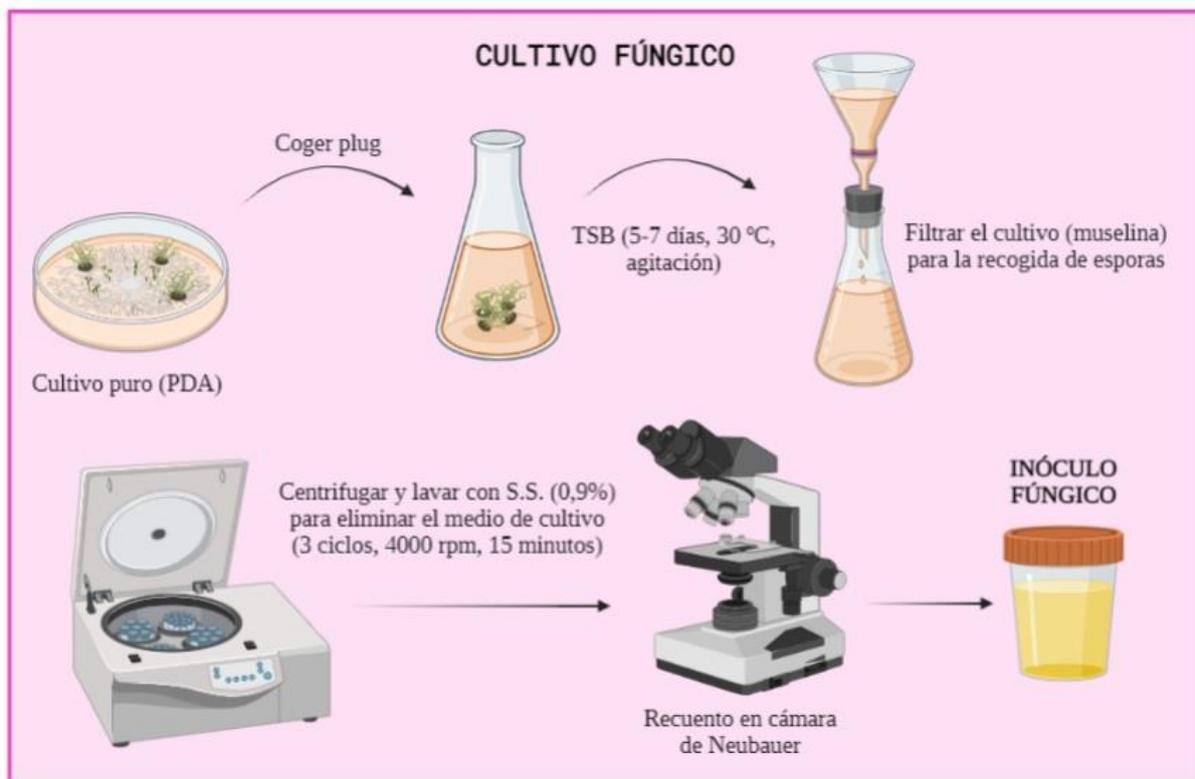
El material de partida estuvo compuesto por restos vegetales procedentes de agricultura intensiva, y restos de poda. Los residuos se trituraron con un tamaño de partícula en torno a 5 cm y se mezclaron en una proporción 1/1 con el fin de conseguir una relación C/N cercana a 25. La mezcla resultante se humedeció con agua para alcanzar una humedad en torno a 65%, y se repartió en diferentes bandejas de plástico con tapadera a razón de 1 kg por bandeja, de forma previa a su inoculación (Figura 9).



**Figura 9.** Acondicionamiento de los materiales de forma previa a su inoculación (Elaboración propia utilizando Biorender).

### 3.6. Preparación del inóculo, inoculación y condiciones de incubación

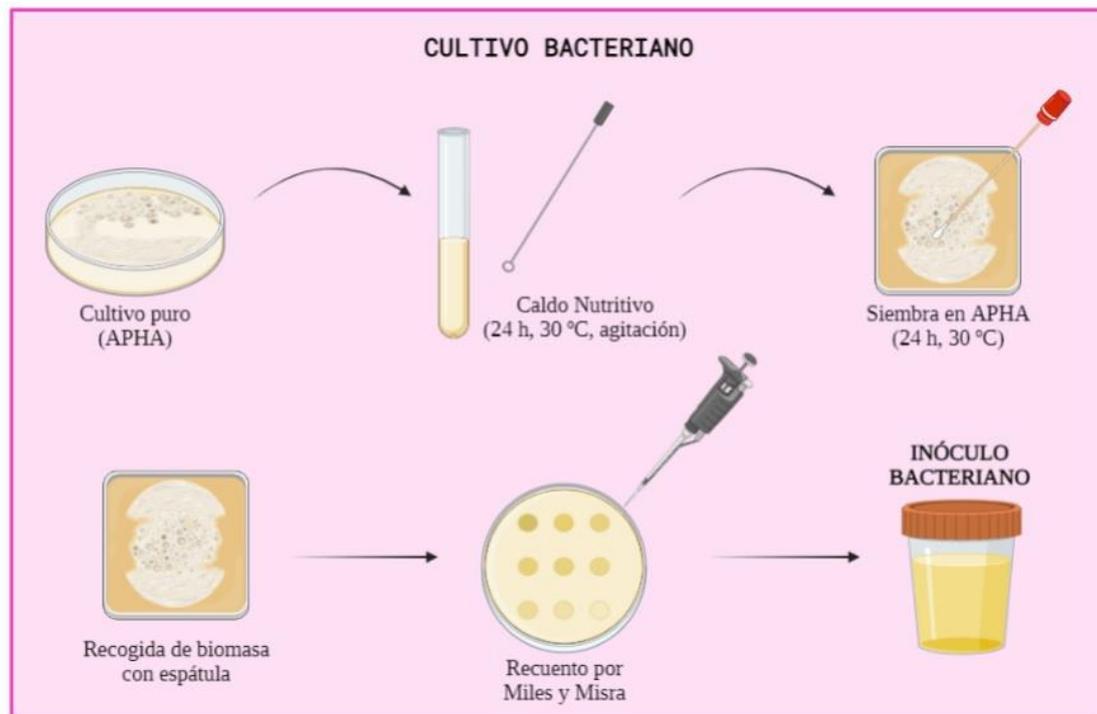
Para preparar el inóculo del agente fúngico (Figura 10) se partió de un cultivo puro del hongo en una placa de PDA, a partir del cual se tomó un fragmento de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de lado y se sembró en medio TSB. El cultivo se incubó durante un periodo de 5-7 días, a 30 °C y en agitación a 120 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación las esporas del hongo se recogieron mediante filtración con tela de muselina estéril, para retirar los restos de micelio fúngico. La suspensión de esporas se sometió a tres ciclos de centrifugación (15 minutos, 4000 rpm), y se utilizó solución salina al 0,9% para el lavado del inóculo entre ciclo y ciclo de centrifugación. Para conocer la concentración final del inóculo fúngico se realizó un recuento en cámara de Neubauer a microscopio óptico. La concentración final de inóculo se ajustó finalmente en torno a 10<sup>6</sup> conidios/mL. Todo el proceso se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad.



**Figura 10.** Procedimiento de obtención del inóculo fúngico (Elaboración propia utilizando Biorender).

Por otra parte, para preparar el inóculo bacteriano (Figura 11) se siguieron protocolos similares para ambas cepas de *Bacillus* spp. En este caso, se partió de un cultivo puro de cada cepa en placas de medio APHA, a partir de las cuales se realizaron sendos pases a tubos con 5 mL de Caldo Nutritivo. Los tubos inoculados se dejaron crecer en la cámara de incubación durante 24 horas a 30 °C y en agitación. A las 24 horas se realizó una siembra en masa con la ayuda de un hisopo estéril en placas cuadradas con medio APHA y se incubaron durante 24-48 horas a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación,

con la ayuda de una espátula estéril, se recogió la biomasa bacteriana y se conservó en agua destilada estéril. Para conocer la concentración de los inóculos bacterianos, se realizaron recuentos utilizando el método establecido por Miles *et al.* (1938), en solución salina. La densidad de inóculo final de ambas cepas bacterianas se estimó en torno a  $10^9$  UFC/mL. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.



**Figura 11.** Procedimiento de obtención de los inóculos bacterianos (Elaboración propia utilizando Biorender).

Para la inoculación de los materiales se tuvieron en cuenta dos dosis de inóculo diferentes: una dosis alta (D1) y una dosis baja (D2), que fueron fijadas en  $10^6$  y  $10^4$  UFC/g de residuo, respectivamente. En primer lugar, se rotularon las bandejas con los códigos correspondientes a las dosis (D1 y D2), el tratamiento (*Fusarium oxysporum*, Consorcio y Control), el tiempo de muestreo (0, 10 y 30 días) y las réplicas (R1, R2 y R3). y después se llevó a cabo la inoculación aplicando las dosis con la ayuda de una micropipeta de 1000 microlitros. Las bandejas utilizadas como control del proceso solo contenían la mezcla de residuos, no aplicándose ningún tratamiento en este caso.

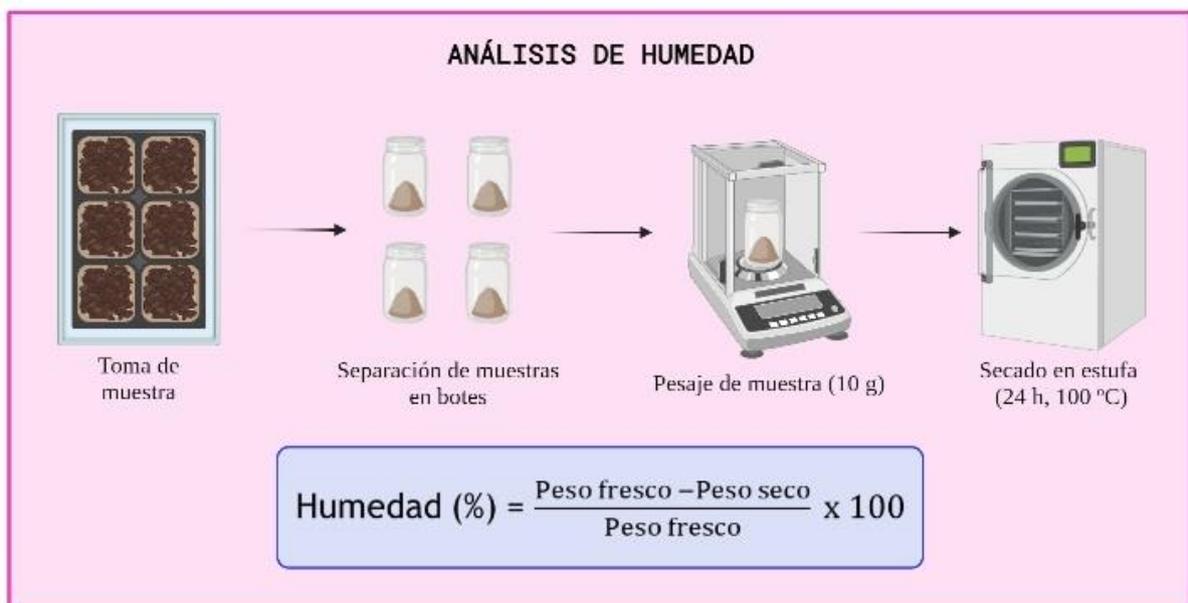
Las bandejas inoculadas se incubaron en torno a 25 °C en oscuridad y se realizaron volteos manuales, cada 48-72 horas, para favorecer la aireación de los residuos y así evitar problemas de anaerobiosis.

### 3.7. Parámetros de seguimiento

Para llevar a cabo un estudio del efecto de los tratamientos biológicos sobre la degradación de los restos vegetales se realizaron una serie de análisis con el fin de estudiar diferentes parámetros indicadores del nivel de biodegradación de los residuos. Todos los análisis se realizaron a tiempo 0, 10 y 30 días. En el momento de los muestreos, el material se trasladó desde las bandejas a bolsas de plástico formato *zip* para facilitar el manejo de las muestras en el laboratorio. La mitad del material se reservó para conservar en congelación a -20 °C. El análisis de humedad y de los índices respirométricos se llevó a cabo a partir de muestras frescas, mientras que la materia orgánica y las fibras se analizaron a partir de material seco y molido.

#### 3.7.1. Humedad, Materia Orgánica y Cenizas

El cálculo de la humedad de las muestras se realizó por pérdida de peso. Para ello se tomó una muestra húmeda de 10 g a partir del material recogido de cada una de las bandejas y se introdujeron en recipientes de cristal. Se apuntó el peso exacto de los recipientes vacíos, así como el peso de cada una de las muestras, y se secaron en horno Pasteur (Modelo: JP Selecta) durante 24 horas a una temperatura de 100 °C. Pasadas 24 h, las muestras se sacaron del horno y una vez enfriados los recipientes de cristal, se volvieron a pesar. Finalmente se calculó el porcentaje de humedad atendiendo a la fórmula que aparece en la Figura 12:



**Figura 12.** Procedimiento para el cálculo de la humedad de las muestras (Elaboración propia utilizando Biorender).

Para el cálculo de la materia orgánica y las cenizas, en primer lugar, el material vegetal se secó durante 24 h a 100 °C en horno Pasteur, y posteriormente se trituroó utilizando un molino (modelo MF 10 Basic, IKA) con un tamiz con una granulometría de 1mm (MF 1.0 Sieve, IKA). En paralelo, se prepararon crisoles de porcelana, previamente desecados en horno a 100 °C durante 20 minutos, para retirar la humedad, y se dejaron en el desecador hasta su completo enfriamiento. En cada uno de los crisoles se depositó 1 gramo de la muestra previamente triturada. Después los crisoles se introdujeron en un horno mufla (Modelo HK-11, Hobersal) durante 3 horas y media a 550 °C. Una vez pasado el tiempo en el horno mufla se pesaron los crisoles en la balanza de precisión. Tanto el porcentaje de materia orgánica como el de cenizas se calcularon empleando las fórmulas que se indican en la Figura 13.

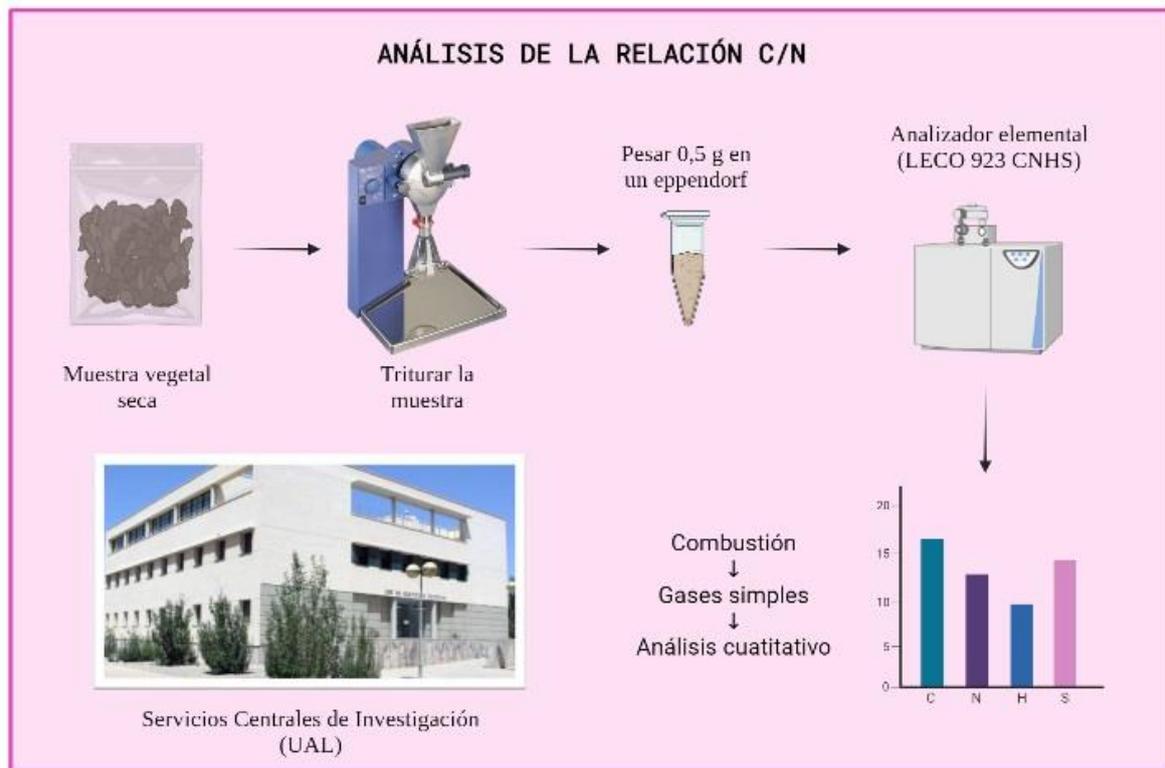


**Figura 13.** Procedimiento para el cálculo del porcentaje de materia orgánica y cenizas de la muestra (Elaboración propia utilizando Biorender).

### 3.7.2. Relación C/N

Para calcular la relación C/N se utilizó material seco y molido con un tamiz de una granulometría de 1mm (MF 1.0 Sieve, IKA). Las muestras se analizaron en los Servicios Técnicos de la Universidad de Almería. Para el análisis se utilizó un Analizador Elemental (LECO 923 CNHS), el cual permite un análisis rápido del contenido total de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre. Las muestras se sometieron a una combustión, convirtiéndolas en gases simples, y realizándose una determinación

cuantitativa del Carbono y Nitrógeno totales (Figura 14). Finalmente, se calculó el ratio C/N a partir de los porcentajes de C y N totales presentes en las muestras.



**Figura 14.** Procedimiento para el análisis de la relación C/N (Elaboración propia utilizando Biorender).

### 3.7.3. Análisis respirométrico: Índice Respirométrico Acumulado (AT<sub>4</sub>)

Los índices respirométricos se utilizan para controlar la estabilidad de la materia orgánica y evaluar su biodegradabilidad. Dos parámetros son clave para realizar e interpretar un análisis respirométrico (Barrena *et al.*, 2013; Mejías *et al.*, 2017). A continuación, se indican las principales diferencias entre ambos:

- Índice Respirométrico Dinámico (IRD<sub>24</sub>), es la medida directa del consumo de oxígeno durante las 24 horas de máxima actividad, en un sistema que permite la aportación de oxígeno mediante la adición de un caudal de aire controlado y la medida del oxígeno contenido en los gases de salida.
- Índice Respirométrico Acumulado (AT<sub>4</sub>), es el consumo acumulado de oxígeno de una muestra durante 4 días consecutivos.

En este trabajo se calculó el indicador AT<sub>4</sub>, mediante un equipo de respirometría (Figura 15) formado por un sistema de 6 caudalímetros másicos, 6 sensores de oxígeno (Alphasense Ltd., Essex. CM77 7AA UK), 6 reactores de 1L y un baño de agua caliente, así como un software diseñado *ad hoc*

por la Universidad Autónoma de Barcelona que permite calcular el oxígeno consumido por parte de cada una de las muestras analizadas.



Figura 15. Partes del equipo respirométrico utilizado.

Para analizar la biodegradabilidad de las muestras se utilizó una modificación de la metodología descrita por Barrena *et al.*, (2009) y Ponsá *et al.*, (2010). Primero se tomaron 100 g de muestra fresca a partir de cada una de las bandejas y se introdujeron en los reactores (Figura 16). La rejilla metálica en el interior del reactor permitió la correcta colocación del material y una distribución de aire adecuada. Se conectaron todos los tubos de goma para permitir el paso del aire, y los reactores se sumergieron en un baño de agua a 37 °C. Antes de iniciar el proceso, se estableció un flujo de aire en los reactores en torno a 15 L/min con la ayuda de un controlador de flujo (Bronkhorst Hitec, Países Bajos). Una vez iniciado el proceso, el aire de escape de los reactores se envió al sistema de sensores de oxígeno, previamente deshumidificado para evitar la saturación de los sensores. Al final, la biodegradabilidad de las muestras se calculó en base al parámetro  $AT_4$ , y se expresó en  $g\ O_2\ Kg^{-1}\ MO\ h^{-1}$ .

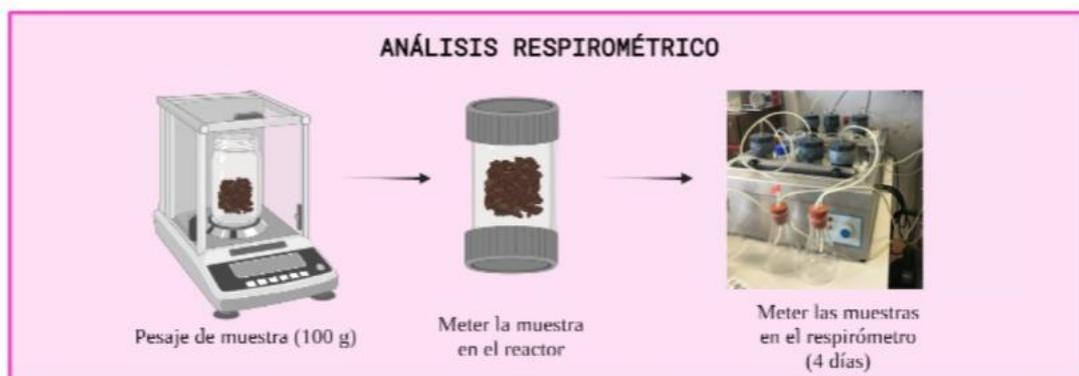


Figura 16. Procedimiento para la realización del análisis respirométrico (Elaboración propia utilizando Biorender).

### 3.7.4. Análisis de fibras: contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina y tasas de degradación

Se realizó un análisis de fibras para calcular el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina de las muestras, mediante el protocolo proporcionado por *ANKOM Technology Corporation*, que es una adaptación del método establecido por Goering y Van Soest en 1970. Para ello, se utilizó un digestor Modelo ANKOM<sup>200</sup> Fiber Analyzer. El protocolo aplicado fue diferente para cada fracción lignocelulósica, utilizándose tres detergentes diferentes (ver apartado 3.3.). Se pesaron 0,5 g de muestra, previamente seca y triturada, y se pasaron a bolsas de poliéster (libres de nitrógeno y cenizas) las cuales se cerraron con un termosellador (Figura 17).



**Figura 17.** Analizador de fibras ANKOM<sup>200</sup>, junto con el suspensor de muestras y las bolsas.

Para abordar la primera fase del procedimiento con el detergente neutro (FND), se colocaron 24 bolsas sobre el suspensor, el cual fue introducido en el interior de la cubeta del digestor. Con la llave de purga cerrada, se añadió el detergente neutro (ANKOM, ref. FND20C), 10 g de sulfito sódico y 2 mL de  $\alpha$ -amilasa (ANKOM Technology, Lote TAHTL-WE22), se cerró la tapadera del digestor y se procesaron las muestras durante 75 minutos en agitación, a una temperatura de 100 °C. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de 5 minutos con agua destilada caliente y en agitación, llevando los dos primeros lavados 2 mL de  $\alpha$ -amilasa. A continuación, se sacaron las bolsas del digestor, se retiró el exceso de agua y se sumergieron en acetona pura durante 5 minutos bajo la campana extractora de gases. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el exceso de acetona de las bolsas y se colocaron en una bandeja metálica para dejarlas secar por completo en horno Pasteur durante 2 horas y media a una temperatura de 100 °C.

Después, las mismas bolsas se sometieron al detergente ácido (FAD) (ANKOM, ref. FAD20C) durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de 5 minutos con agua destilada caliente y en agitación, y un lavado durante 5 minutos en acetona pura. Se retiró el exceso de acetona de las bolsas y se colocaron en una bandeja metálica para meterlas en la estufa y dejarlas secar por completo, durante 2 horas y media a 100 °C. Por último, las muestras se sometieron a un tratamiento con ácido sulfúrico 24N (LFAD) durante 3 horas. En un vaso de precipitado de vidrio se metieron las bolsas con el ácido, quedando bien sumergidas. Transcurrido el tiempo, se hicieron varios lavados, primero con agua caliente y después con agua fría, hasta que se alcanzó un pH neutro. Finalmente, las bolsas se

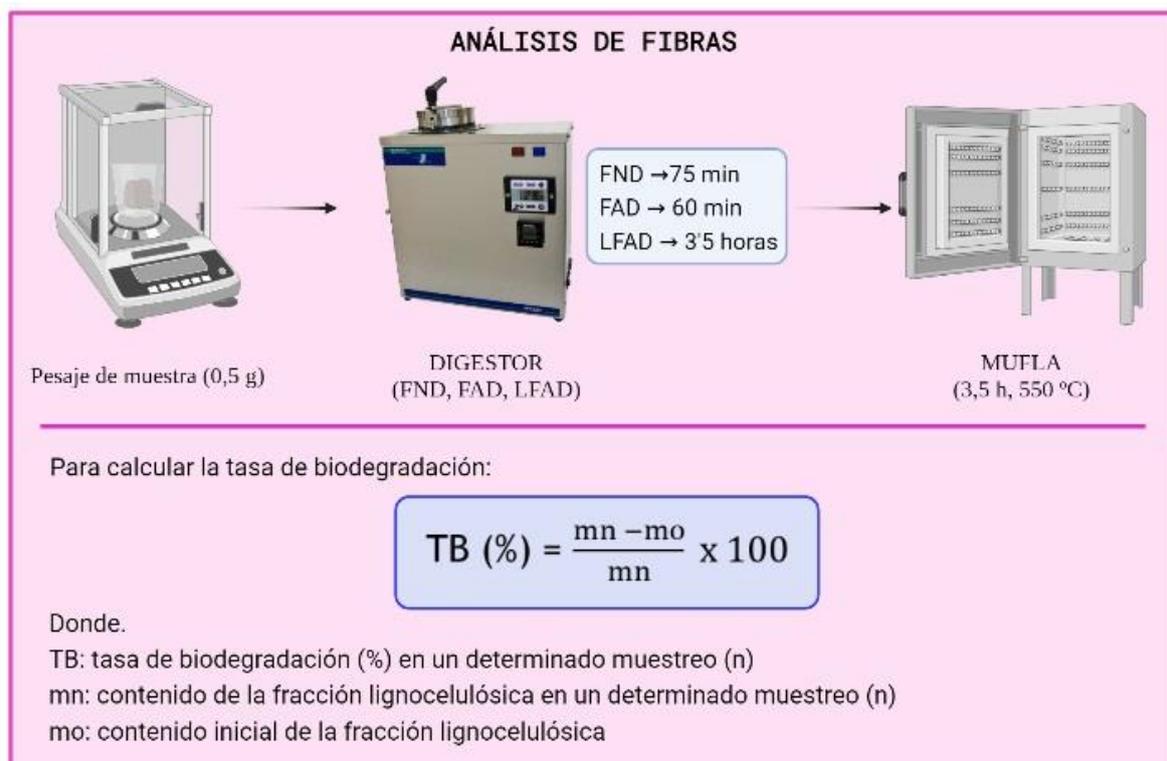
lavaron durante 5 minutos con acetona pura. Se retiró posteriormente el exceso de acetona de las bolsas y se colocaron en una bandeja para dejarlas secar por completo en la estufa durante 2 h y media a una temperatura de 100 °C.

Finalmente, una vez que las bolsas estaban completamente secas, se pesaron y se ubicaron en crisoles de porcelana para incinerar las muestras en el horno mufla durante 3,5 h a 550 °C. Una vez transcurrido el tiempo del horno mufla y una vez enfriados los crisoles, se pesaron las cenizas.

El detergente neutro (FND) deja un residuo compuesto por las tres fracciones (celulosa, hemicelulosa y lignina), el detergente ácido (FAD) deja la fracción compuesta por la celulosa y la lignina, y el ácido sulfúrico (LFAD) deja solamente la fracción de la lignina, por lo que después de utilizar los tres detergentes se pueden cuantificar todas las fracciones de fibras presentes en los residuos vegetales:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ FND} - \% \text{ FAD}; \quad \% \text{ Celulosa} = \% \text{ FAD} - \% \text{ LFAD}; \quad \% \text{ Lignina} = \% \text{ LFAD}$$

Para calcular la tasa de biodegradación de las tres fracciones (Figura 18), se utilizó la fórmula establecida por Wang *et al.*, 2011:



**Figura 18.** Protocolo simplificado para el análisis de fibras y fórmula para calcular la tasa de biodegradación (Elaboración propia utilizando Biorender).

### 3.8. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, para obtener las tablas y gráficas representadas en este trabajo. Además, con el programa Statgraphics Centurión XVIII se realizó un análisis comparativo utilizando el Análisis de la Varianza (ANOVA) Multifactorial. También se realizaron pruebas de comparación múltiple (Test LSD de Fisher, de la mínima diferencia significativa) para establecer diferencias entre los distintos niveles de los factores analizadas ( $p < 0,05$ ) y un análisis de funciones discriminantes con objeto de agrupar los resultados de estudio en función del pretratamiento utilizado.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

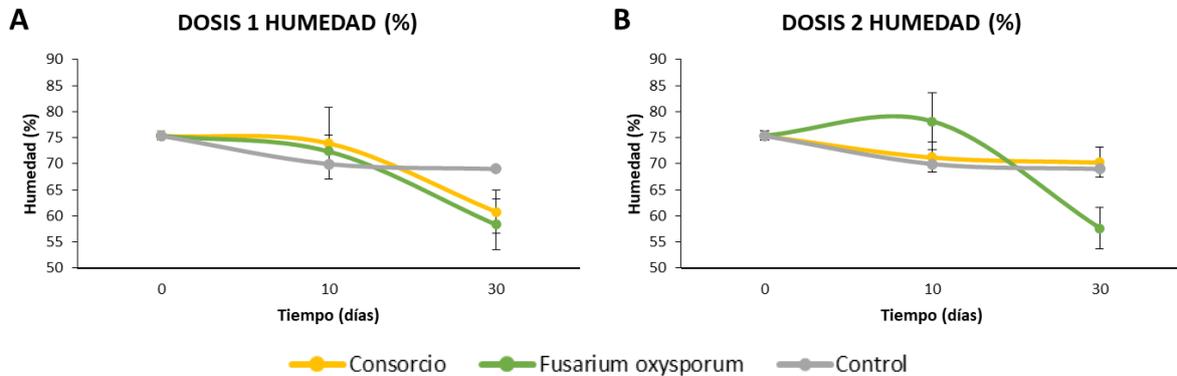
Este trabajo se ha centrado, en términos generales, en la aplicación de diferentes microorganismos lignocelulolíticos como tratamiento biológico de residuos vegetales de forma previa a su entrada en procesos de compostaje. Se pretende favorecer la degradación de la fracción de lignocelulosa y con ello acelerar la fase biooxidativa del proceso de compostaje, acortando así el tiempo de finalización del proceso. Todo ello sin que el producto final se vea perjudicado en términos de calidad. De acuerdo con las Fases Experimentales, previamente presentadas, se muestran a continuación los resultados obtenidos.

### 4.1. Humedad

Según Moreno y Mormeneo (2008), un rango del 20-65% de humedad podría considerarse adecuado para que ocurra la descomposición aeróbica de la materia orgánica. No obstante, es complicado fijar un valor estándar para este parámetro, ya que muestra una gran dependencia con respecto a las propiedades del material vegetal de partida, en términos de tamaño de partícula, composición o capacidad de retención de agua. No obstante, cuando una mezcla de residuos orgánicos muestra un porcentaje de agua por debajo de lo deseable, se puede inhibir el intercambio de nutrientes, mientras que si la muestra contiene un porcentaje de agua muy elevado se dificulta la transferencia de oxígeno, por lo que existe un mayor riesgo de anaerobiosis. Ambas condiciones provocan un descenso de actividad por parte de los microorganismos aerobios, lo que repercute en la eficacia del proceso, así como en la calidad del producto final (Yeh *et al.*, 2020).

En este trabajo, al inicio del tratamiento, los valores de humedad estuvieron en torno al 75%, lo que pudo deberse en este caso a las características del material vegetal de partida, el cual mostró un contenido en agua superior a lo esperado (Figura 19). Aunque la humedad estuvo por encima de la recomendada, no se generaron problemas de anaerobiosis y el ensayo pudo llevarse a cabo según lo planificado. Como se puede ver en la Figura 19, para las dos dosis de tratamiento, la humedad fue disminuyendo a lo largo del tiempo, llegando a alcanzar valores en torno al 57%, mientras que en las

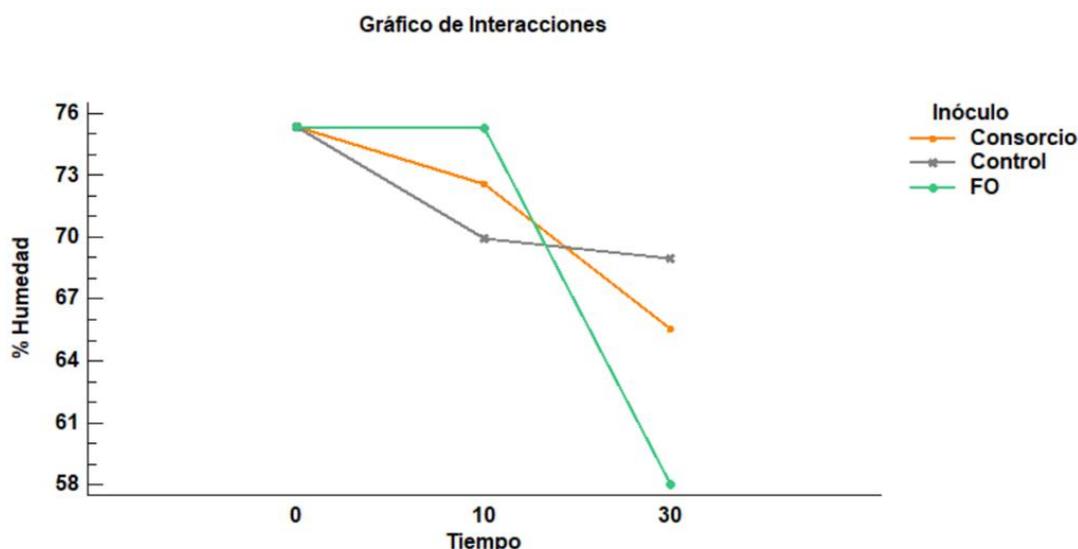
muestras no inoculadas la humedad se mantuvo más o menos constante, sin bajar del 70% al final del ensayo.



**Figura 19.** Evolución del porcentaje de humedad de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo en función de la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)).

Se pudo observar un descenso de la humedad más pronunciado en las muestras inoculadas con *F. oxysporum* y el Consorcio a dosis 1, después de 30 días de incubación (Figura 19A), lo que puede ser indicativo de una mayor actividad microbiana en las muestras tratadas, con respecto a lo observado en los controles no tratados. Dicho efecto fue diferente cuando se aplicaron dosis de inóculo más bajas (Figura 19B). En este caso, las muestras inoculadas con el Consorcio microbiano mostraron una tendencia similar a lo observado en las muestras no tratadas. Por otra parte, en el caso de las muestras tratadas con *F. oxysporum* a dosis 2, no se observó variación de la humedad durante los primeros 10 del ensayo lo que puede relacionarse con una menor actividad microbiana de las muestras al inicio del tratamiento.

En términos estadísticos, el análisis de interacción entre los factores Tiempo/Inóculo reveló de forma global que, a partir de los 10 días de incubación, el descenso de la humedad fue más notable en las mezclas de residuos inoculadas con *F. oxysporum*, mientras que las muestras inoculadas con el Consorcio, o en los controles sin inocular, se observó una tendencia muy similar (Figura 20). No obstante, es importante tener en cuenta el comportamiento de los inóculos a diferentes dosis.



**Figura 20.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre el contenido en humedad (FO: *Fusarium oxysporum*).

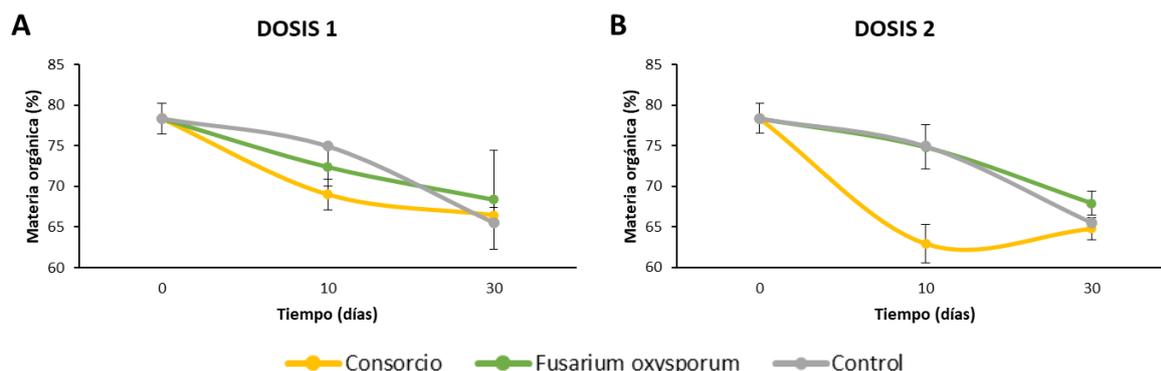
En definitiva, a la vista de los resultados obtenidos, se puede determinar que el contenido de humedad de las muestras tratadas a dosis 1 a partir de ambos tipos de inóculos, evoluciona de forma similar en ambos casos, y muestra una tendencia descendente y continuada, hasta la finalización del ensayo. Este hecho puede ser indicativo de una actividad microbiana más intensa en las muestras inoculadas respecto a lo observado en las no tratadas.

#### 4.2. Materia orgánica y cenizas

El proceso de compostaje se considera un método adecuado para llevar a cabo la degradación y estabilización de la materia orgánica. A lo largo del proceso se destruyen los patógenos en la fase termófila y al final del proceso se forman sustancias húmicas como resultado de la mineralización y humificación de la materia orgánica (Wojcieszak *et al.*, 2021). La materia orgánica está compuesta por un conjunto heterogéneo de sustancias entre las que se encuentran numerosos compuestos de carbono, que van desde azúcares, proteínas y otros constituyentes, ácidos de bajo peso molecular como el ácido acético y el oxálico (la mayoría fácilmente mineralizables), hasta compuestos complejos más recalcitrantes como la lignina (Budziak *et al.*, 2004). En la fase inicial, los microorganismos utilizan primero las sustancias disponibles, como azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos, hasta agotar las sustancias fácilmente asimilables, mientras que los compuestos más refractarios comienzan a descomponerse en fases más avanzadas. Los productos resultantes de la hidrólisis se polimerizan dando lugar a las sustancias húmicas, que se producen durante las fases finales (enfriamiento y maduración) del compostaje (Wu *et al.*, 2022).

Respecto a los ensayos realizados para el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster, hay que destacar que, aunque los experimentos realizados no pueden compararse con un proceso de

compostaje real, las reacciones que ocurren sobre el componente orgánico de las mezclas de residuos pretratadas, pueden ser muy similares a lo que ocurre en las primeras fases del compostaje. Inicialmente, en el ensayo de inoculación realizado, los materiales de partida mostraron un elevado contenido en materia orgánica, en torno al 75-80%. Sin embargo, durante los 30 días de tratamiento se observó una disminución de este valor de manera progresiva hasta alcanzar valores del 65-70% pasados 30 días de tratamiento (Figura 21).

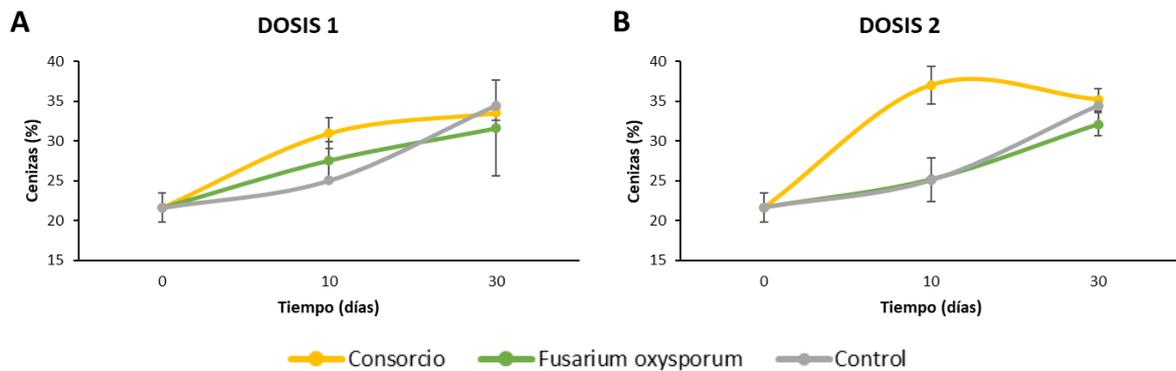


**Figura 21.** Evolución del porcentaje de materia orgánica en las muestras tratadas en función del tiempo y la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)).

Como se puede observar en la Figura 21, aunque el valor final de materia orgánica es similar en todos los casos, después de 30 días de tratamiento, si se observaron importantes diferencias en función del inóculo aplicado. En este caso, cuando se utilizó la dosis alta (Figura 21A), el descenso de la materia orgánica a los 10 días de tratamiento, se produjo de una forma más rápida en las muestras inoculadas, sobre todo en el caso de la aplicación del consorcio microbiano, en relación a lo observado en el control sin inocular. Esta observación apoya la idea de que la aplicación de inoculantes microbianos puede activar la degradación de los materiales de partida. En el caso de la aplicación de la dosis más baja (Figura 21B), las muestras inoculadas con el consorcio experimentaron una notable reducción del contenido en materia orgánica pasados los 10 días de tratamiento, pasando de un 78% hasta un 64%, mientras que las muestras inoculadas con *F. oxysporum* mostraron un comportamiento similar al control (Figura 21B).

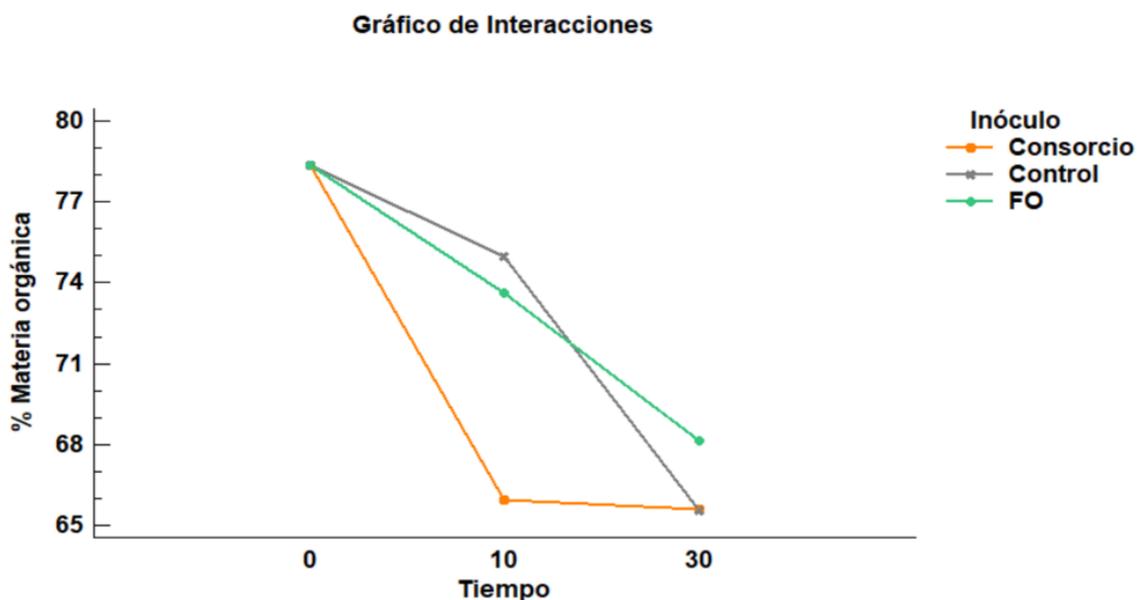
Por otra parte, las cenizas están compuestas por una variedad de minerales inorgánicos y su acumulación, a lo largo del tiempo, es un buen indicador de que los procesos de transformación se están llevando a cabo de forma adecuada (Subova *et al.*, 2021). El contenido en cenizas se relaciona indirectamente con el contenido de materia orgánica y directamente con el grado de mineralización de las muestras, por lo que la interpretación gráfica de los resultados mostrados en la Figura 22 se encuentran lógicamente en consonancia con los resultados previamente mostrados en la Figura 21. Como puede observarse en la Figura 22, la mineralización de las muestras se incrementó en todos los

casos a lo largo del tiempo, aunque dicho fenómeno se vio acelerado en el caso de las muestras tratadas con el consorcio a dosis bajas (Figura 21).



**Figura 22.** Evolución del porcentaje de cenizas en las muestras tratadas en función del tiempo y la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)).

En términos estadísticos, el análisis de la interacción entre los factores Tiempo/Inóculo reveló diferencias significativas, de manera que el contenido de materia orgánica descendió de forma significativamente más rápida en las muestras inoculadas con el Consorcio después de 10 días de tratamiento (Figura 23), y se mantuvo prácticamente constante hasta el final del ensayo.

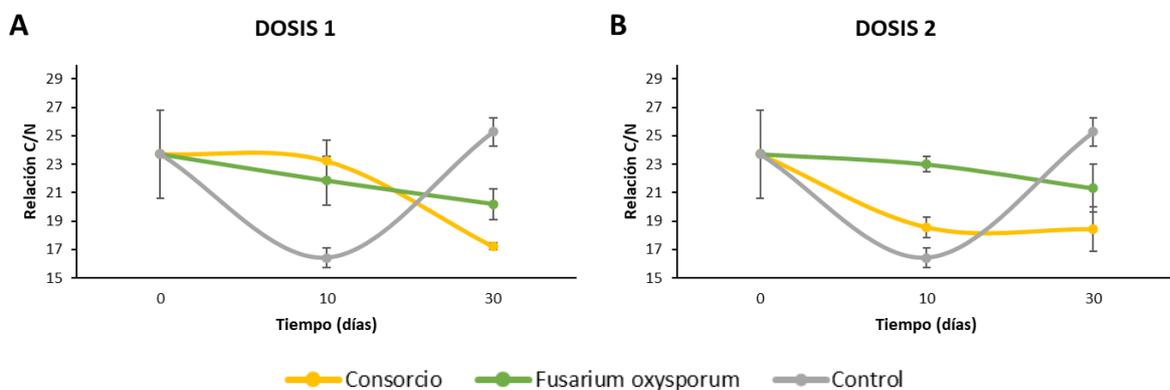


**Figura 23.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre el contenido en materia orgánica (FO: *Fusarium oxysporum*).

### 4.3. Relación C/N

Antes de iniciar un proceso de compostaje es importante caracterizar los materiales de partida desde un punto de vista físico-químico. El desarrollo de los microorganismos durante el proceso de compostaje, está determinado especialmente por la relación C/N, ya que representa las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para su crecimiento. Al inicio del proceso de compostaje la relación C/N debe estar entre 25 y 30, aunque muchos autores han utilizado valores que se sitúan entre 20 y 50 (Ghinea y Leahu, 2020). Cuando la relación C/N es excesivamente alta el proceso de compostaje se ralentiza y se vuelve más lento, al haber una cantidad de nitrógeno proporcionalmente menor. Cuando la relación es baja, el exceso de nitrógeno se puede perder por lixiviación o volatilización en forma de amoníaco. En este caso, para aumentar la relación C/N se pueden utilizar materiales acondicionadores que proporcionen más aporte de carbono (Gao *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta, por tanto, que la proporción C/N al inicio del proceso de compostaje es un factor crucial para que éste se desarrolle de forma adecuada, la implantación de un pretratamiento biológico previo al compostaje debe tener en cuenta que la relación C/N no debería disminuir en exceso, ya que podría afectar a la activación posterior de la fase biooxidativa del proceso.

En este trabajo, la relación C/N de las mezclas se encontraba inicialmente en torno a 24, por lo que está dentro de los valores establecidos como óptimos para la puesta en marcha de un proceso de compostaje (Figura 24).



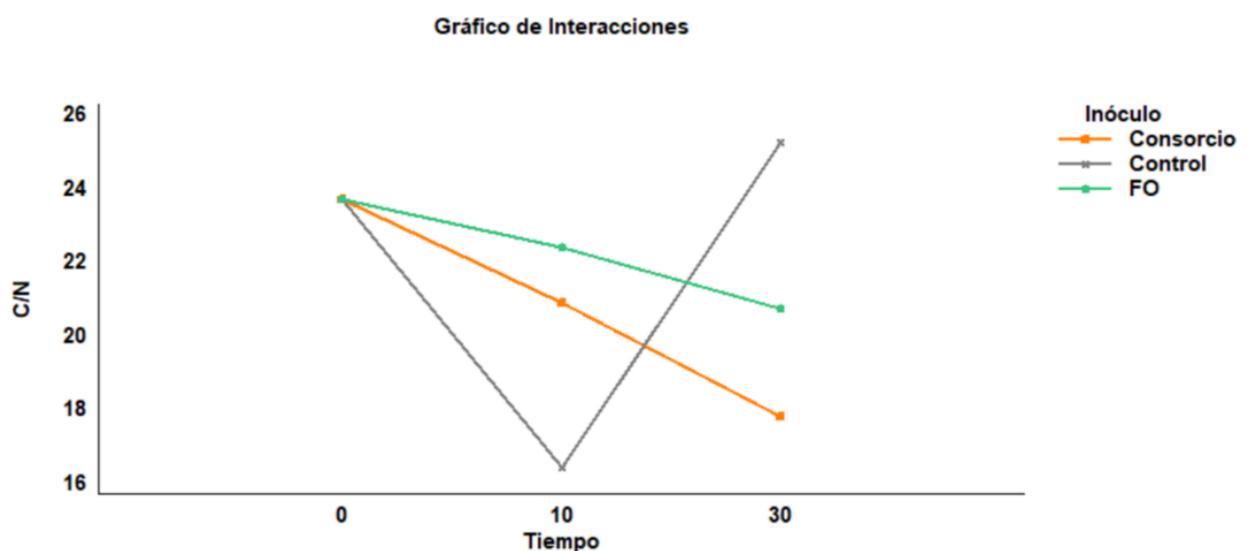
**Figura 24.** Evolución de la relación C/N en las muestras tratadas en función del tiempo y la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)).

Conforme fue avanzando el tiempo de incubación, la relación C/N fue disminuyendo de manera gradual y suave durante los 30 días de incubación en las muestras inoculadas. No se observaron diferencias significativas entre dosis, aunque en el caso de la dosis 2 (Figura 24B), se observó un descenso más brusco de la relación C/N a partir de las muestras inoculadas con el Consorcio, pasando de un valor inicial de 23,71% a 18,44% después de 10 días de incubación. Al final de los 30 días los valores de C/N oscilaron en un rango aproximado de 18 a 21, en el caso de las muestras sometidas a los distintos tratamientos.

Por otra parte, el comportamiento de las muestras control fue muy diferente al observado en las muestras inoculadas. Así, se observó un brusco descenso de la relación C/N a los 10 días, alcanzando valores por debajo de 17. Según Moreno y Moral (2008), si las mezclas que van a ser sometidos al proceso de compostaje tienen una relación C/N con valores inferiores a 18-19, el compostaje se llevará a cabo con mayor rapidez, pero el nitrógeno se perderá en forma de amoníaco. Esta pérdida de nitrógeno puede afectar negativamente a la calidad fertilizante del producto final, y puede suponer, además, un problema ambiental, y provocar malos olores en el entorno. Por ello, el uso de pretratamientos biológicos antes del compostaje de residuos, no debe suponer una reducción excesiva de la relación C/N, ya que se podría afectar la puesta en marcha del proceso de compostaje, así como la calidad del producto final (Azim *et al.*, 2018).

En general, las muestras no tratadas mostraron una reducción de la relación C/N más irregular en comparación con las muestras inoculadas. Tras el brusco descenso observado a los 10 días, la relación C/N volvió a incrementarse hasta un valor cercano al inicial pasados los 30 días desde la inoculación. Este hecho podría explicarse debido a una desaceleración de la actividad biológica en la muestras control, hecho que no ocurre en las muestras tratadas con *F. oxysporum* o el Consorcio.

Aunque de forma independiente, los factores Dosis e Inóculo no influyeron significativamente sobre la relación C/N, dicho parámetro si se vio afectado por la interacción entre los factores Tiempo/Inóculo (Figura 25). En este caso, se pudo confirmar, con carácter general, que ambos pretratamientos provocaron un descenso suave de la relación C/N durante el tiempo de incubación de las muestras, alcanzándose valores de relación C/N a los 10 días en torno a 22 (Figura 25). Desde un punto de vista práctico, no sería conveniente alargar el tiempo de incubación de las muestras inoculadas hasta 30 días, ya que un mayor descenso en los valores de C/N previos al proceso de compostaje podría ser contraproducente.

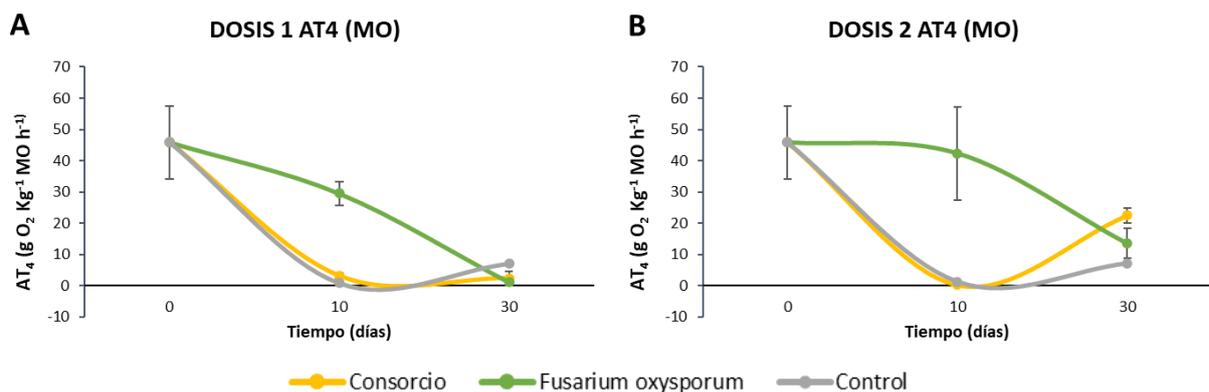


**Figura 25.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre la relación C/N (FO: *Fusarium oxysporum*).

#### 4.4. Análisis Respirométrico

La concentración de oxígeno influye en la actividad de los numerosos grupos microbianos que están presentes en el proceso de compostaje (Zheng *et al.*, 2018). Las pruebas de estabilidad biológica suelen basarse en métodos respirométricos que miden la producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que llevan a cabo la degradación de la materia orgánica (Aspray *et al.*, 2015). Según Barrena *et al.*, (2014), los índices de respiración aeróbica son ampliamente sugeridos como medida del contenido en materia orgánica biodegradable. Para medir la estabilidad biológica del material a compostar se suelen utilizar el Índice de Respiración Dinámica (IRD) y el Índice de Respiración Acumulado Dinámico (AT<sub>4</sub>), que mide el consumo de oxígeno que ocurre en una muestra durante 4 días de incubación. De este modo, al inicio del compostaje la mezcla de residuos debería presentar una mayor tasa de biodegradabilidad, lo que implica una demanda y consumo de oxígeno superiores a lo esperado en compost más estabilizados, o incluso ya maduros (Azim *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, cabe pensar que la inoculación de las mezclas de residuos con microorganismos lignocelulolíticos de forma previa al compostaje, podría servir para incrementar la biodegradabilidad de los materiales, en comparación con mezclas de residuos sin inocular. Como se observa en la Figura 26, el uso de *F. oxysporum* a ambas dosis de tratamiento (Figura 26A y 26B) presentó valores de AT<sub>4</sub> significativamente superiores a los observados para el resto de los tratamientos, después de 10 días de incubación. A los 30 días de incubación, el valor de AT<sub>4</sub>, fue muy similar entre los distintos tratamientos, aunque a dosis más bajas (Figura 26B), la tasa de biodegradabilidad se recuperó, en el caso del tratamiento con el Consorcio microbiano, hasta alcanzar valores en torno a 20 g O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> MO h<sup>-1</sup>.

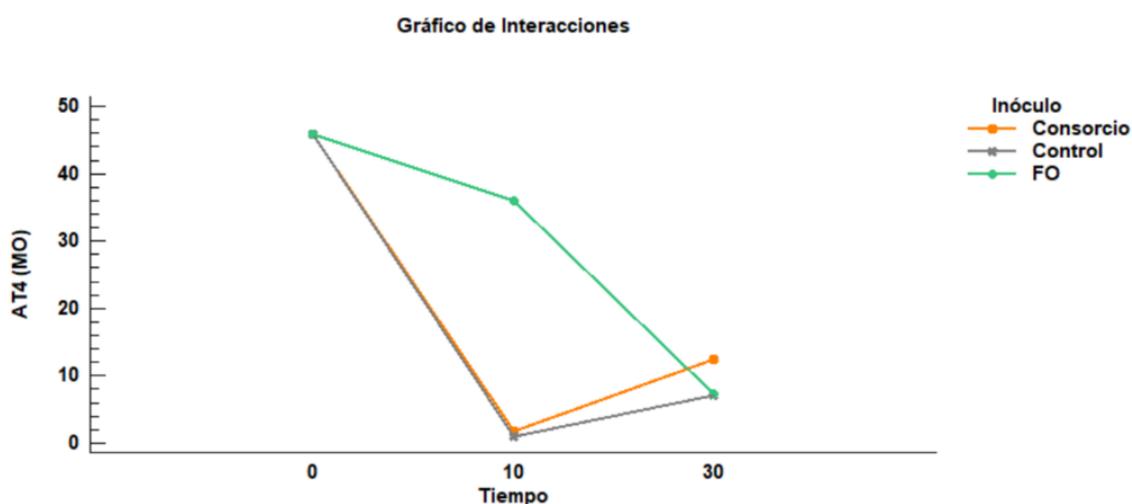


**Figura 26.** Evolución del valor de AT<sub>4</sub> en las muestras tratadas en función del tiempo y la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)).

El hecho de que el bloque de muestras inoculadas con *F. oxysporum* mantenga un valor de AT<sub>4</sub> elevado 10 días después de la inoculación, hace pensar que el uso de este hongo como tratamiento biológico de residuos lignocelulósicos puede resultar de gran interés biotecnológico, ya que la

demanda de O<sub>2</sub> se mantiene por encima de lo observado para el resto de tratamientos, confirmando que la biodegradabilidad de las muestras es aún elevada (Figuras 26A y 26B). De igual modo, la inoculación de las muestras con el Consorcio microbiano a dosis baja, deja ver un incremento de la biodegradabilidad de los materiales a partir de los 10 días de incubación (Figura 26B).

En términos generales, el análisis estadístico de los resultados derivados del estudio respirométrico, mostró la influencia significativa de la interacción entre los factores Tiempo/Inóculo (Figura 27). En este caso, se confirmó que la aplicación de *F. oxysporum* dio lugar a tasas de biodegradabilidad elevadas después de 10 días de tratamiento, en comparación con lo observado para el resto de tratamientos.



**Figura 27.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre el análisis respirométrico (FO: *Fusarium oxysporum*).

#### 4.5. Análisis de Fibras

La materia orgánica de origen vegetal sufre varias transformaciones durante el proceso de compostaje debidas, principalmente, a la actividad microbiana. Los compuestos más simples (solubles) y los que se liberan tras el ataque enzimático de los materiales poliméricos por parte de los microorganismos, sirven de nutrientes para el crecimiento y la actividad microbiana. Por su parte, otros compuestos poliméricos más complejos, parcialmente degradados, o casi imposibles de transformar, contribuyen a la formación de sustancias de tipo húmico. De esta manera, cabe esperar que aquellos materiales vegetales inoculados con microorganismos lignocelulolíticos, provoquen una mayor liberación de compuestos solubles, al haber degradado parte de los compuestos poliméricos más recalcitrantes (Jurado *et al.*, 2015).

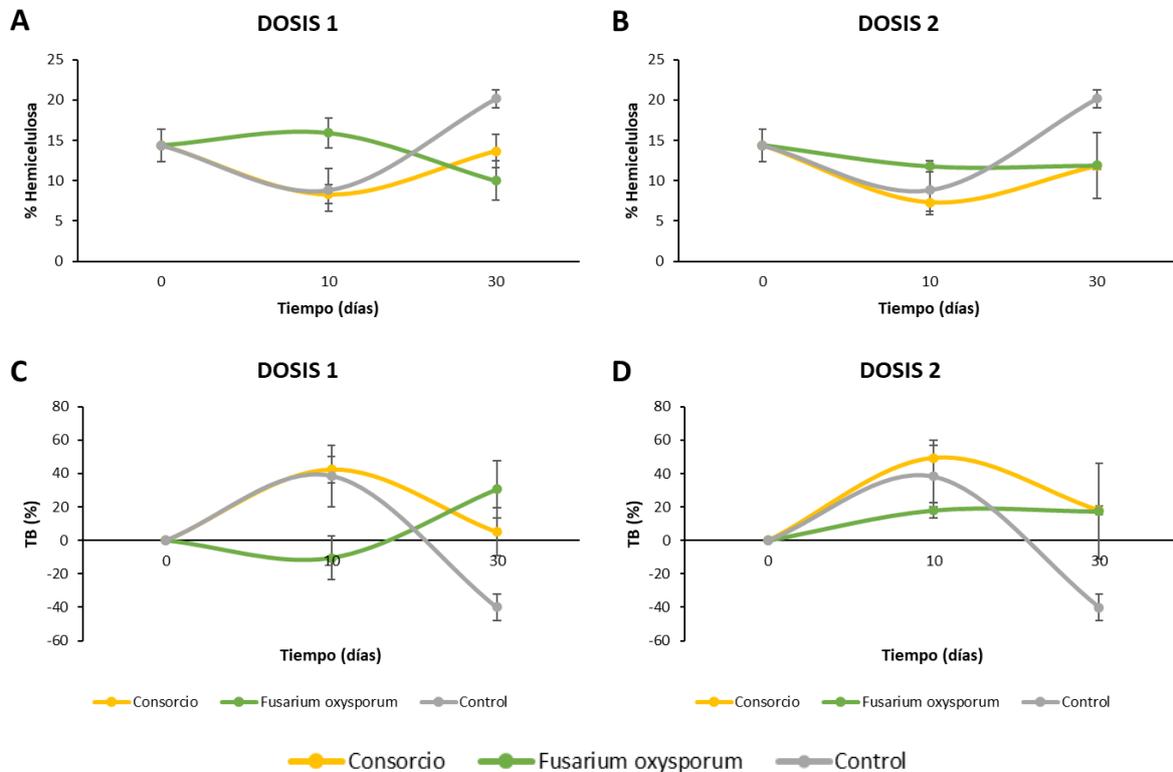
A continuación, se muestra la evolución de las diferentes fracciones lignocelulósicas a lo largo de los 30 días que duró el ensayo de inoculación. Los resultados se representan tanto en función de los porcentajes absolutos de hemicelulosa, celulosa y lignina, así como las diferentes tasa de biodegradación de las tres fracciones. Hay que tener en cuenta que el comportamiento de la matriz de

lignocelulosa no puede analizarse de manera independiente al resto de los parámetros analizados, ya que todos influyen en la biodegradabilidad de los restos vegetales.

#### 4.5.1. Porcentaje de hemicelulosa y tasa de biodegradación

La hemicelulosa se compone de varias pentosas (arabinosa, xilosa) y hexosas (glucosa, manosa, galactosa). Estos polisacáridos lineales tienen cadenas laterales cortas y un menor grado de cristalización respecto a la celulosa (Kobeticova y Nabelkova, 2021). Durante el proceso de compostaje, si se considera el polímero de lignocelulosa globalmente, la fracción de hemicelulosa es el componente más fácilmente degradable por parte de los microorganismos (Duan *et al.*, 2021).

En este trabajo, la inoculación con los dos tratamientos biológicos dio lugar a un descenso suave del porcentaje de hemicelulosa (Figura 28A y 28B) que pudo observarse, sobre todo, durante los primeros 10 días desde que se llevó a cabo la inoculación de los residuos. En el caso de las muestras tratadas con el Consorcio a dosis 1 y 2, se llegaron a alcanzar tasas de biodegradación cercanas al 50% (Figura 28C y 28D) después de 10 días de tratamiento. Por otra parte, *F. oxysporum* se comportó de manera diferente según la dosis aplicada, produciéndose una degradación de la hemicelulosa más intensa cuando se empleó a dosis más bajas (Figura 28D).

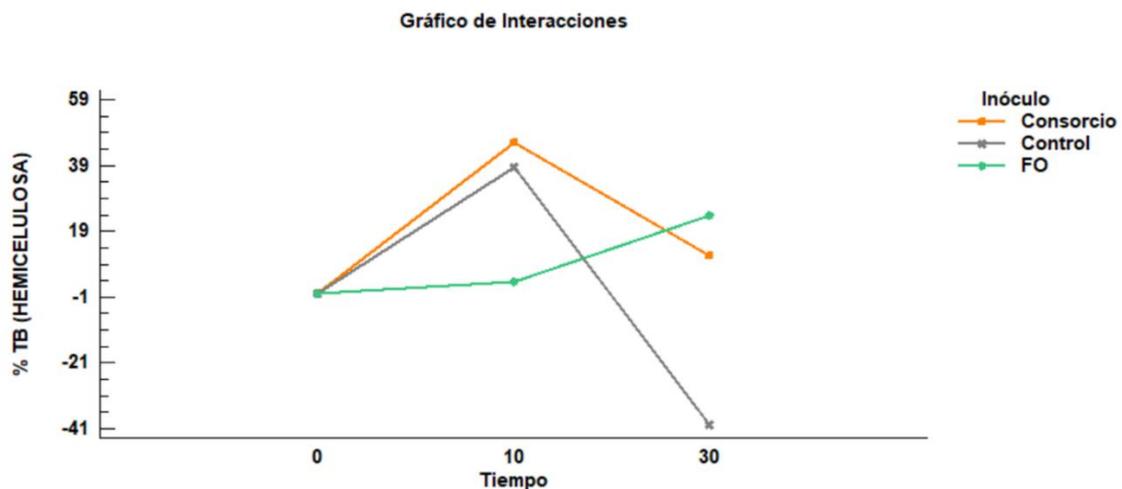


**Figura 28.** Evolución del contenido de hemicelulosa (A y B) y de la tasa de biodegradación de hemicelulosa (C y D) en función del tiempo y la dosis utilizada de inóculo (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)). TB: Tasa de Biodegradación.

El comportamiento de las muestras control fue, sin embargo, muy distinto al resto de bloques experimentales, sobre todo pasados los primeros 10 días de incubación. En este caso, los porcentajes de hemicelulosa se llegaron a incrementar después de 10 días (Figuras 28A y 28B), coincidiendo esto con la curva de relación C/N observada para las muestras control (Figura 24). Este fenómeno podría relacionarse con un descenso de la actividad biológica y con un freno del proceso de mineralización.

Como se ha indicado previamente en el apartado 3.2. de Material y Métodos, las dos cepas de *Bacillus spp.* utilizadas en el consorcio, habían sido caracterizadas como cepas hemicelulolíticas en trabajos previos (datos no mostrados), lo que podría justificar las mayores tasas de biodegradación observadas en las muestras inoculadas con el Consorcio, respecto a las muestras inoculadas únicamente con el hongo (Figura 28C y 28D). Este fenómeno puede ser indicativo de la existencia de posibles sinergias entre las cepas que componen el consorcio. En cualquier caso, después de 30 días de incubación, las tasas de degradación de la hemicelulosa siempre fueron superiores a lo observado en las muestras tratadas con respecto a lo ocurrido en los tratamientos control (Figura 28C y 28D).

En términos estadísticos, aunque la dosis de inóculo no influyó significativamente sobre la tasa de biodegradación de la hemicelulosa, el análisis estadístico de los resultados si reveló la influencia significativa de la interacción Tiempo/Inóculo, mostrando globalmente un efecto positivo del Consorcio, respecto a la inoculación exclusiva con la cepa de *F. oxysporum* (Figura 29). Además, ambos tratamientos mostraron globalmente un efecto activador de la tasa de degradación de la hemicelulosa con respecto a los controles, sobre todo a partir de los 10 días de incubación.



**Figura 29.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre la tasa de biodegradación de la hemicelulosa (% TB) (FO: *Fusarium oxysporum*).

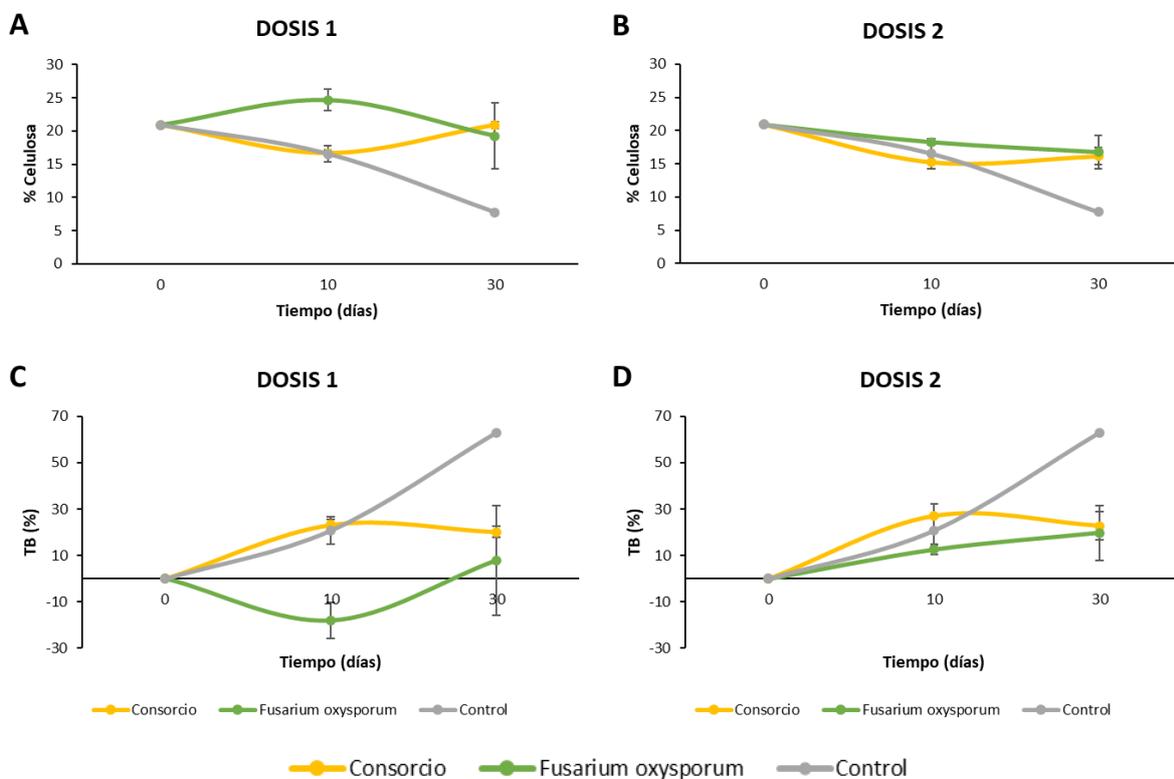
#### 4.5.2. Porcentaje de celulosa y tasa de biodegradación

La hidrólisis de la celulosa ocurre a través de las actividades sinérgicas de varias enzimas glucósido hidrolasas, secretadas principalmente por hongos, aunque también se han descrito algunas

bacterias capaces de llevar a cabo la degradación de la celulosa. En un segundo paso, las  $\beta$ -glucosidasas, convierten el disacárido celobiosa en glucosa, y completan el paso final de la hidrólisis de la celulosa (Hu *et al.*, 2019).

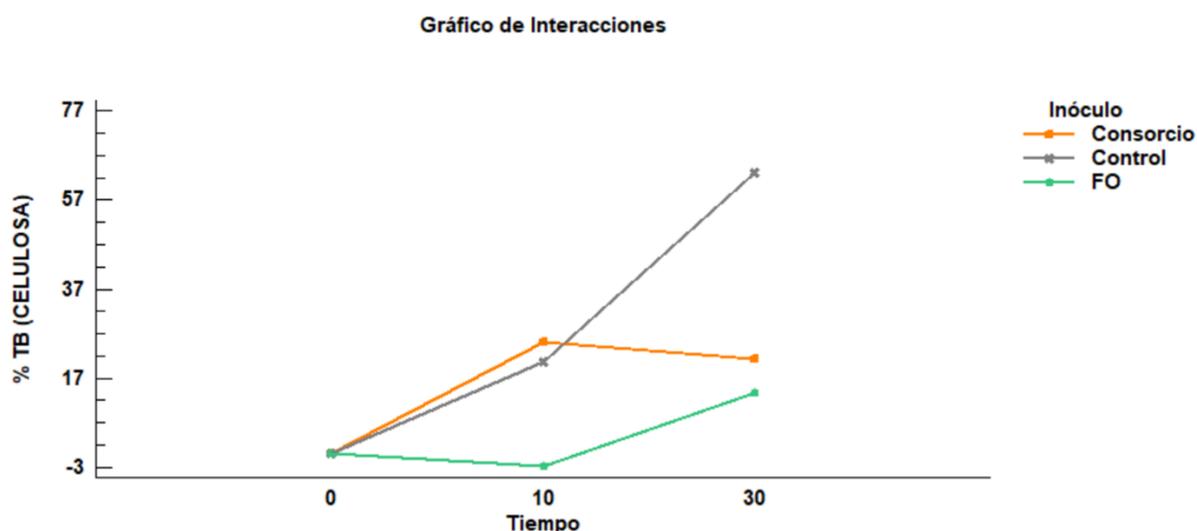
Los resultados obtenidos, en este caso, mostraron que el porcentaje de celulosa descendió a lo largo del tiempo utilizando ambos tratamientos, aunque el descenso fue más pronunciado transcurridos 10 días desde la inoculación de las muestras con el Consorcio (Figura 30A y 30B). Por lo general, ambos tratamientos dieron lugar a mayores tasas de biodegradación a dosis bajas de inóculo (Figura 30D), alcanzando tasas de degradación de celulosa cercanas al 30%, 10 días después de la inoculación con el Consorcio.

A pesar de que *F. oxysporum* 4535 se ha caracterizado previamente como una cepa lignocelulolítica (datos no mostrados), la aplicación del Consorcio dio lugar a mayores tasas de biodegradación de celulosa, lo que revela la existencia de un posible efecto sinérgico entre las cepas del consorcio. Sin embargo, en contra de lo esperado, pasados 30 días de incubación, la tasa de degradación de celulosa en las muestras control fue muy superior a la de las muestras inoculadas con ambos tratamientos (Figura 30C y 30D), lo que puede ser indicativo de que algunos fenómenos de competencia pueden inhibir o ralentizar la actividad de otros microorganismos celulolíticos presentes en los materiales inoculados.



**Figura 30.** Evolución del contenido de celulosa (A y B) y tasa de biodegradación de celulosa (C y D) en función del tiempo y la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)). TB: Tasa de Biodegradación.

El análisis de interacciones realizado a nivel estadístico reveló la influencia significativa de la interacción entre los factores Tiempo/Inóculo, pudiéndose confirmar que, si se comparan ambos tratamientos, la inoculación con el consorcio resultó ser la más efectiva después de 10 días de incubación, en relación con la degradación de celulosa (Figura 31). La degradación de la celulosa también pudo observarse en las muestras inoculadas con la cepa fúngica, aunque no fue significativa hasta 30 días después de realizarse la inoculación.



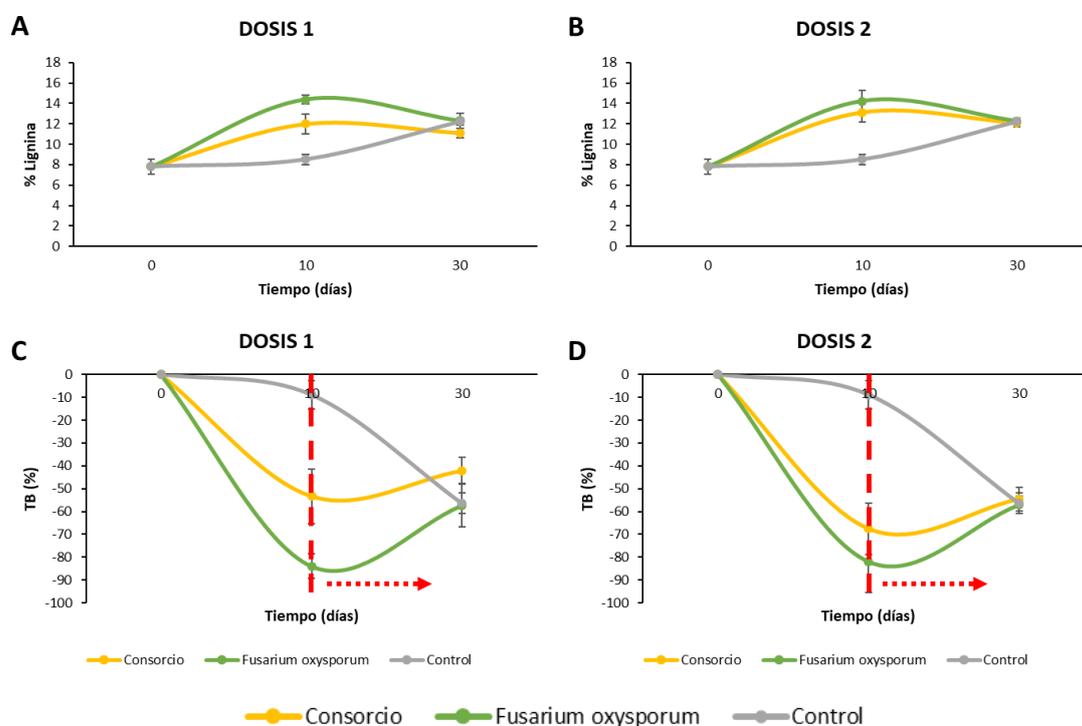
**Figura 31.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre la tasa de biodegradación de la celulosa (% TB) (FO: *Fusarium oxysporum*).

#### 4.5.3. Porcentaje de lignina y tasa de biodegradación

La lignina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. Químicamente es un heteropolímero fenólico estructuralmente complejo, bioquímicamente muy estable y de elevado peso molecular (Dash *et al.*, 2021; Mendes *et al.*, 2021). La lignina es un polímero complejo de origen natural extremadamente resistente a la degradación microbiana. Durante el compostaje, la degradación de la lignina ocurre en las fases finales del proceso, aunque suelen presentarse tasas de degradación muy bajas (Fersi *et al.*, 2019). Según Eklind y Kirchmann (2000), es común que la cantidad de lignina se mantenga constante e incluso que aumente a lo largo del proceso en función de las transformaciones físico-químicas y biológicas a las que se ve sometido dicha molécula. Además, el contenido de este complejo polímero va a determinar también la degradación de otros componentes lignocelulósicos. Así, la lignina actúa como factor protector de la hemicelulosa y la celulosa. En concreto, existe una fuerte asociación entre la hemicelulosa y la lignina, favorecida por la presencia de compuestos fenólicos (Malherbe y Cloete, 2002). Esta compleja asociación de las diferentes fracciones dificulta el acceso de las enzimas ligninolíticas implicadas en los procesos de degradación.

En cuanto a la degradación de lignina en las muestras ensayadas, cabe destacar que sólo después de 10 días de incubación pudo detectarse un leve descenso del porcentaje de lignina en las

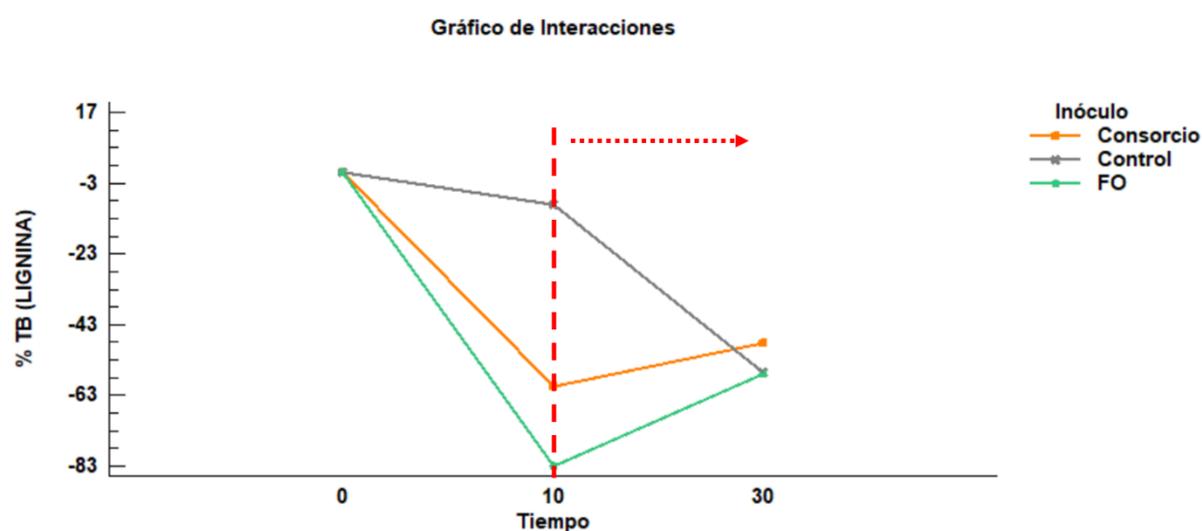
muestras sometidas a los distintos tratamientos (Figura 32A y 32B). Dicho efecto se puso de manifiesto cuando se estimaron las tasas de degradación de la lignina a los 30 días de incubación (Figura 32C y 32D). La línea roja punteada ubicada en las Figuras 32C y 32D, muestra que durante los primeros 10 días de incubación se detecta incluso una mayor proporción de lignina que al principio de la inoculación, lo que se traduce en tasas de degradación negativas. Este fenómeno puede ser consecuencia de las transformaciones que ocurren en paralelo a nivel de las fracciones de hemicelulosa y celulosa. Sólo después de 10 días desde la inoculación, se pudo detectar un leve incremento de la tasa degradación parcial de la lignina, entre 10 y 30 días. Por el contrario, el perfil observado en el caso de las muestras control, no inoculadas, fue muy diferente al resto ya que, en este caso, no se detectó en ningún momento degradación de lignina (Figura 32C y 32D).



**Figura 32.** Evolución del contenido de lignina (A y B) y tasa de biodegradación de lignina (C y D) en función del tiempo y la dosis utilizada (dosis 1: alta (A); dosis 2: baja (B)). TB: Tasa de Biodegradación. Línea punteada roja: límite entre tasas de degradación negativas y positivas

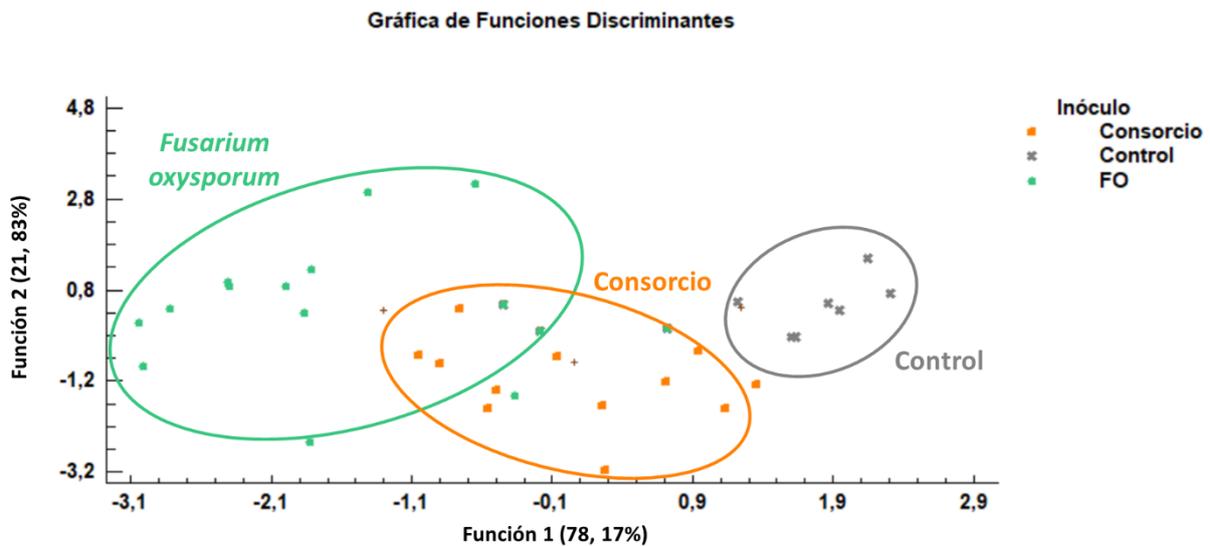
El incremento en el porcentaje de lignina que se produce durante los primeros 10 días de incubación (Figuras 32A y 32B), pudo deberse no solo a la dificultad para degradar este polímero, sino también a la heterogeneidad de las muestras de partida, y a la posible concentración de la biomasa durante el periodo de ensayo. Es posible que las mayores tasas de biodegradación de hemicelulosa y lignina durante las primeras semanas de tratamiento favorecieran la liberación de lignina del entramado de lignocelulosa, y ésta quedara expuesta para ser degradada por los microorganismos en fases más avanzadas del ensayo.

El análisis estadístico de los resultados reveló que la interacción entre los factores Tiempo/Inóculo influyó significativamente sobre la tasa de biodegradación de la lignina (Figura 33). En el gráfico de interacción de factores se puede apreciar que la aplicación de ambos tratamientos microbianos incrementó la tasa de biodegradación de la lignina después de 10 días de tratamiento, hecho que no se observó en ningún momento en las muestras no tratadas. En términos generales, los resultados de degradación parcial (entre tiempo 10 y tiempo 30 días) fueron mejores cuando se aplicó el hongo de forma independiente, en relación a lo observado tras la inoculación con el consorcio (Figura 32 y 33).



**Figura 33.** Representación gráfica del efecto de la interacción entre los factores de variabilidad Tiempo/Inóculo, a un intervalo de confianza del 95%, sobre la tasa de biodegradación de la lignina (% TB) (FO: *Fusarium oxysporum*). Línea punteada roja: límite entre tasas de degradación negativas y positivas

Finalmente, a partir de todos los datos obtenidos, se llevó a cabo un Análisis de Funciones Discriminantes. Este procedimiento está diseñado para desarrollar un conjunto de funciones discriminantes que pueden ayudar a predecir resultados en base a los valores derivados de un conjunto de variables cuantitativas. En este análisis, 54 casos y 7 variables predictoras fueron utilizadas para desarrollar un modelo que discriminara entre los 3 niveles de Inóculo. Se obtuvieron 2 funciones discriminantes estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0%. La Función 1, aportó el 78% de variabilidad a los resultados mientras que la Función 2 aportó el 22% (Figura 34). Los datos se agruparon en tres conjuntos que correspondieron a cada uno de los tratamientos biológicos (*Fusarium oxysporum*, Consorcio y Control). Gracias a este análisis se puede confirmar que la aplicación de los distintos tratamientos biológicos dio lugar a un comportamiento diferente de las muestras, en cuanto a perfiles físico- químicos, biodegradabilidad de las muestras y tasas de degradación de las distintas fracciones lignocelulósicas.



**Figura 34.** Análisis de Funciones Discriminantes para todas las variables de estudio, en función del tratamiento utilizado.

A pesar de las bajas tasas de degradación de la lignina, en este trabajo se pusieron de manifiesto claras diferencias entre aplicar o no un tratamiento biológico en mezclas compuestas por restos vegetales. Así, la inoculación con *F. oxysporum* y el Consorcio, sirvió para “movilizar” la red compleja formada por la hemicelulosa, la celulosa y la lignina durante los primeros 10 días de incubación de las muestras. Dicha movilización podría servir para activar la biodegradabilidad de las muestras durante las primeras semanas de incubación, incrementar las tasas de degradación de las fracciones lignocelulósicas, y con ello acelerar *a posteriori* la fase biooxidativa del proceso de compostaje, sin sacrificar por ello la obtención de compost de calidad.

## 5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. En términos generales, la inoculación de residuos vegetales con la cepa *Fusarium oxysporum* 4535 (FO), y con el Consorcio formado por dicho hongo, junto con *Bacillus licheniformis* 1974 y *Bacillus safensis* 190, influyó de forma notable en el carácter biodegradable de las mezclas inoculadas.
2. Las muestras inoculadas con la cepa *Fusarium oxysporum* 4535, mostraron valores superiores de AT<sub>4</sub> transcurridos 10 días después del tratamiento, en comparación con el resto de muestras. Por otra parte, aunque de forma discreta, la inoculación con este hongo favoreció la degradación de la lignina en las fases más avanzadas del ensayo.
3. La inoculación de restos vegetales con el Consorcio microbiano provocó un notable, aunque no excesivo, descenso de la materia orgánica y de la relación C/N transcurridos 10 días desde el inicio del tratamiento. Así mismo, la aplicación del Consorcio a dosis bajas dio lugar a tasas de degradación de hemicelulosa y celulosa más elevadas después de 10 días de tratamiento, en comparación con lo observado tras la aplicación del hongo en cultivo puro o de los controles no tratados.
4. Por tanto, la aplicación de tratamientos biológicos de corta duración (10 días), a base de consorcios microbianos lignocelulolíticos, resulta una estrategia válida y de enorme interés a la hora de establecer protocolos de bioactivación de residuos vegetales de forma previa al proceso de compostaje.

## 6. FINANCIACIÓN

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

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez Hernández, J. 2013. Estudio de un proceso de compostaje industrial de residuos vegetales hortícolas. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería. Almería, España.

Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Santek, B. 2018. Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences* 18 (11), 768-778.

Arantes, V., Goodell, B. 2014. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials* 1158, 3-21.

Aspray, T. J., Dimambro, M. E., Wallace, P., Howell, G., Frederickson, J. 2015. Static, dynamic and inoculum augmented respiration-based test assessment for determining in-vessel compost stability. *Waste Management* 42, 3-9.

Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S., Thami-Alami, I. 2018. Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture* 8, 141-158.

Aznar-Sánchez, J. A., Velasco-Muñoz, J. F., García-Arca, D., López-Felices, B. 2020. Identification of opportunities for applying the circular economy to intensive agriculture in Almería (South-East Spain). *Agronomy-Basel* 10 (10), 1499.

Barrena, R., Artola, A., Font, X., Pognani, M., Ponsá, S., Colón, J., Riggieri, L., Sánchez, A. 2013. La Respirometría como herramienta para la clasificación de la biodegradabilidad de residuos orgánicos. Resultados de la experiencia de 10 años. Grupo de investigación en compostaje, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Barrena, R., d'Imporzano, G., Ponsa, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Sanchez, A., Adani, F. 2009. In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. *Journal of Hazardous Materials* 162 (2-3), 1065-1072.

Barrena, R., Font, X., Gabarrell, X., Sánchez, A. 2014. Home composting versus industrial composting: influence of composting system on compost quality with focus on compost stability. *Waste Management* 34 (7), 1109-1116.

Battista, F., Frison, N., Bolzonella, D. 2019. Energy and nutrients' recovery in anaerobic digestion of agricultural biomass: an italian perspective for future applications. *Energies* 12 (17), 3287.

Baudoin, W., Nono-Womdim, R., Lutaladio, N., Hodder, A., Castilla, N., Leonardi, C., Pascale, S.D.e., Qaryouti, M. 2013. Good agricultural practices for greenhouse vegetable crops. Principles for Mediterranean Climate Areas, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy.

Bhuvaneshwari, S., Hettiarachchi, H., Meegoda, J. N. 2019. Crop residue burning in India: policy challenges and potential solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (5), 832.

Birgovan, A. L., Vatca, S. D., Bacali, L., Szilagy, A., Lakatos, E. S., Cioca, L. I., Ciobanu, G. 2022. Enabling the circular economy transition in organizations: a moderated mediation model. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (2), 677.

Biyada, S., Merzouki, M., Demcenko, T., Vasiliauskiene, D., Ivanec-Goranina, R., Urbonavicius, J., Marciulaitiene, E., Vasarevicius, S., Benlemlih, M. 2021. Microbial community dynamics in the mesophilic and thermophilic phases of textile waste composting identified through next-generation sequencing. *Scientific Reports* 11 (1), 23624.

Brigagao, G. V., de Medeiros, J. L., Araujo, O. D. F., Mikulcic, H., Duic, N. 2021. A zero-emission sustainable landfill-gas-to-wire oxyfuel process: bioenergy with carbon capture and sequestration. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 138, 110686.

Budziak, C. R., Maia, C. M. B. F., Mangrich, A. S. 2004. Chemical transformations of organic matter during the composting of wood industry wastes (residues). *Química Nova* 27 (3), 399-403.

Chang, C., Li, R. 2019. Agricultural waste. *Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation* 91 (10), 1150-1167.

Coolen, P. V. R., Makoondlall-Chedee, T., Bokhoree, C., Foogoo, R. 2021. Investigating composting as a mitigation strategy for climate change using a modelling approach. *European Journal of Sustainable Development* 10 (4), 97-107.

Coskuner, G., Jassim, M. S., Nazeer, N., Damindra, G. H. 2020. Quantification of landfill gas generation and renewable energy potential in arid countries: case study of Bahrain. *Waste Management & Research* 38 (10), 1110-1118.

Dabrowska, D., Rykala, W. 2021. A review of lysimeter experiments carried out on municipal landfill waste. *Toxics* 9 (2), 26.

Dash, P. K., Padhy, S. R., Bhattacharyya, P., Pattanayak, A., Routray, S., Panneerselvam, P., Nayak, A. K., Pathak, H. 2021. Efficient lignin decomposing microbial consortium to hasten rice-straw composting with moderate GHGs fluxes. *Waste and Biomass Valorization* 13 (1), 481-496.

Daugela, I., Visockiene, J. S., Kumpiene, J., Suzdalez, I. 2021. Measurements of flammable gas concentration in landfill areas with a low-cost sensor. *Energies* 14 (13), 3967.

Díaz Bolívar, I. 2021. Obtención de compost fitoestimulantes y biopesticida mediante la adición de microorganismos. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería. Almería, España.

Duan, H. Y., Ji, M. H., Xie, Y. K., Shi, J. P., Liu, L., Zhang, B. G., Sun, J. S. 2021. Exploring the microbial dynamics of organic matter degradation and humification during co-composting of cow manure and bedding material waste. *Sustainability* 12 (23), 13035.

Duque-Acevedo, M., Belmonte-Urena, L. J., Plaza-Úbeda, J. A., Camacho-Ferre, F. 2020. The management of agricultural waste biomass in the framework of circular economy and bioeconomy: an opportunity for greenhouse agriculture in southeast Spain. *Agronomy-Basel* 10 (4), 489.

Egea, F. J., Torrente, R. G., Aguilar, A. 2018. An efficient agro-industrial complex in Almería (Spain): towards an integrated and sustainable bioeconomy model. *New Biotechnology* 40, 103-112.

Eklind, Y., Kirchmann, H. 2000. Composting and storage of organic household waste with different litter amendments. I: carbon turnover. *Bioresource Technology* 74 (2), 115-124.

Epelde, L., Jauregi, L., Urra, J., Ibarretxe, L., Romo, J., Goikoetxea, I., Garbisu, C. 2018. Characterization of composted organic amendments for agricultural use. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2, 44.

FAO. 2017. Organización para la Alimentación y la Agricultura: El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2017. Fomentando la resiliencia en aras de la paz y la seguridad alimentaria. Disponible en: <https://www.refworld.org/es/docid/5b0860214.html> [último acceso el 11 Julio 2022]

Fersi, M., Mbarki, K., Gargouri, K., Mechichi, T., Hachicha, R. 2019. Assessment of organic matter biodegradation and physico-chemical parameters variation during co-composting of lignocellulosic wastes with *Trametes trogii* inoculation. *Environmental Engineering Research* 24 (4), 670-679.

Fu, B., Chen, L., Huang, H. Y., Qu, P., Wei, Z. G. 2021. Impacts of crops residues on soil health: a review. *Environmental Pollutants and Bioavailability* 33 (1), 164-173.

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

Ghinea, C., Leahu, A. 2020. Monitoring of fruit and vegetable waste composting process: relationship between microorganisms and physico-chemical parameters. *Processes* 8 (3), 302.

Goering, H. K., Van Soest, P. J. 1970. *Agricultural Handbook* (nº 379). Agricultural Research Service. USDA, Washington.

Greff, B., Szigeti, J., Nagy, A., Lakatos, E., Varga, L. 2021. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: a review. *Journal of Environmental Management* 302B, 114088.

Grgic, D. K., Domanovac, M. V., Domanovac, T., Sabic, M., Cvetnic, M., Bulatovic, V. O. 2019. Influence of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* BSW and Clinoptilolite addition on the biowaste composting process. *Arabian Journal for Science and Engineering* 44 (6), 5399-5409.

Hu, T., Wang, X. J., Zhen, L. S., Gu, J., Zhang, K. Y., Wang, Q. Z., Ma, J. Y., Peng, H. L., Lei, L. S., Zhao, W. Y. 2019. Effects of inoculating with lignocellulose-degrading consortium on cellulose-degrading genes and fungal community during co-composting of spent mushroom substrate with swine manure. *Bioresource Technology* 291, 121876.

Huang, L. Z., Ma, M. G., Ji, X. X., Choi, S. E., Si, C. L. 2021. Recent developments and applications of hemicellulose from wheat straw: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, 690773.

Instituto Nacional de Estadística. Recuperado de <https://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?path=/t26/e068/p02/serie/I0/&file=03001.px>. Consultado en mayo 2022.

Intharathirat, R., Salam, P. A. 2016. Valorization of MSW-to-energy in Thailand: status, challenges and prospects. *Waste and Biomass Valorization* 7 (1), 31-57.

Junta de Andalucía. 2018. Estrategia andaluza de Bioeconomía Circular. <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarrollosostenible/areas/politica-agraria-comun/desarrollo-rural/paginas/estrategia-andaluza-bioeconomia.html>

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.

Lakatos, E. S., Yong, G., Szilagyi, A., Clinci, D. S., Georgescu, L., Iticescu, C., Cioca, L. I. 2021. Conceptualizing core aspects on circular economy in cities. *Sustainability* 13 (14), 7549.

Liang, C., Das, K. C., McClendon, R. W., 2033. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology* 86 (2), 131-137.

Lin, M., Begho, T. 2021. Crop residue burning in South Asia: a review of the scale, effect, and solutions with a focus on reducing reactive nitrogen losses. *Journal of environmental management* 314, 115104.

Liu, Y. L., Liu, J. G. 2021. Mechanism and dynamic evolution of leachate collection system clogging in MSW landfills in China. *Waste Management* 120, 314-321.

López, M. J. y Boluda, R. 2011. Residuos agrícolas. En: *Compostaje* (Moreno, J. y Moral, R. Eds.) pp. 489-518. Mundi Prensa, Madrid.

López, M. J., Jurado, M. M., López-González, J. A., Estrella-González, M. J., Martínez-Gallardo, M. R., Toribio, A., Suárez-Estrella, F. 2021. Characterization of thermophilic lignocellulolytic microorganisms in composting. *Frontiers in Microbiology* 12, 697480.

López, M. J., Vargas-García, M. D., Suárez-Estrella, F., Nichols, N. N., Dien, B. S., Moreno, J. 2007. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and

related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (4), 794-800.

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

Marqués, S. 2010. Valorización de diferentes cultivos lignocelulósicos para la fabricación de pasta de papel: Caracterización química, modificación estructural de sus constituyentes orgánicos durante los procesos de cocción y blanqueo y aplicaciones biotecnológicas. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

Mejías, M., Komolis, D., Gea, T., Sanchez, A. 2017. The effect of airflow rates and aeration mode on the respiration activity of four organic wastes: implications on the composting process. *Waste Management* 65, 22-28.

Mendes, I. V., García, M. B., Bitencourt, A. C. A., Santana, R. H., Lins, P. D., Silveira, R., Simmons, B. A., Gladden, J. M., Kruger, R. H., Quirino, B. F. 2021. Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization. *Plos One* 16 (9), e0255083.

Mishra, S., Singh, P. K., Dash, S., Pattnail, R. 2018. Microbial pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethanation and waste management. *3 Biotech* 8 (11), 458.

Moreno, J., López-González, J. A., Arcos-Nievas, M. A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., Estrella-González, M. J., López, M. J. 2021. Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: a matter of thermotolerance. *Science of the Total Environment* 773, 145587.

Moreno, J., López, M. J., Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F. 2013. Recent advances in microbial aspects of compost production and use. *International Symposium on Growing Media (Composting And Substrate Analysis)* 1013, 443-457.

Moreno, J. y Moral, R. (2008). *Compostaje*. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 9788484763468.

Moreno, J. y Mormeneo, S. 2011. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J. y Moral, R. *Compostaje*. pp. 111-140. Mundi-prensa, Madrid.

Ngan, N. V. C., Chan, F. M. S., Nam, T. S., Thao, H. V., Maguyon-Detras, M. C., Hung, D. V., Cuong, D. M., Hung, N. V. Editado por: Gummert, M., VanHung, N., Chivenge, P., Douthwaite, B. 2020. Anaerobic digestion of rice straw for biogas production. *Sustainable Rice Straw Management*, 69-92.

Njoku, P. O., Edokpayi, J. N., Odiyo, J. O. 2019. Health and environmental risks of residents living close to a landfill: a case study of Thohoyandou landfill, Limpopo Province, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (12), 2125.

Nobeticoka, K., Nabelkova, J. 2021. Effect of wood hemicellulose composition on binding interactions with caffeine. *Building* 11 (11), 515.

Nordahl, S. L., Devkota, J. P., Amirebrahimi, J., Smith, S. J., Breunig, H. M., Preble, C. V., Satchwell, A. J., Jin, L., Brown, N. J., Kirchstetter, T. W., Scown, C. D. 2020. Lyfe-cycle greenhouse gas emissions and human health trade-offs of organic waste management strategies. *Environmental Science & Technology* 54 (15), 9200-9209.

Palaniveloo, K., Amran, M. A., Norhashim, N. A., Mohamad-Fauzi, N., Peng-Hui, F., Hui-Wen, L., Kai-Lin, Y., Jiale, L., Chian-Yee, M. G., Jing-Yi, L., Gunasekaran, B., Razak, S. A. 2020. Food waste composting and microbial community structure profiling. *Processes* 8 (6), 723.

Papale, M., Romano, I., Fionre, I., Lo Giudice, A., Piccolo, A., Cangemi, S., Di Meo, V., Nicolaus, B., Poli, A. 2021. Prokaryotic Diversity of the composting thermophilic phase: the case of ground coffee compost. *Microorganisms* 9 (2), 218.

Pena, H., Mendoza, F., Dianez, F., Santos, M. 2020. Parameter selection for the evaluation of compost quality. *Agronomy-Basel* 10 (10), 1567.

Pezzolla, D., Cucina, M., Proietti, P., Calisti, R., Regni, L., Gigliotti, G. The use of new parameters to optimize the composting process of different organic wastes. *Agronomy-Basel* 11 (10), 2090.

Ponsá, S., Gea, T., Sánchez, A. 2010. Different indices to express biodegradability in organic solid wastes. *Journal of Environmental Quality* 39 (2), 706-712.

Raza, M. H., Abid, M., Fisal, M., Yan, T. W., Akhar, S., Adnan, K. M. M. 2022. Environmental and health impacts of crop residue burning: scope of sustainable crop residue management practices. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (8), 4753.

Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology* 53 (4), 349-410.

Sagdeeva, O. A., Krusir, G. V., Tsikalo, A. L., Loyenberger, G., Shpirko, T. V. 2018. Composting of organic waste with the use of mineral additives. *Journal of Food Science and Technology-Ukraine* 12 (1), 43-49.

Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27 (2), 185-194.

Sodergren, J., Larsson, C. U., Wadso, L., Bergstrand, K. J., Asp, H., Hultberg, M., Schelin, J. 2022. Food waste to new food: risk assessment and microbial community analysis of anaerobic digestate as a nutrient source in hydroponic production of vegetables. *Journal of Cleaner Production* 333, 130239.

Solowiej, P., Pochwatka, P., Warwrzyniak, A., Lapinski, K., Lewicki, A., Dach, J. 2021. The effect of heat removal during thermophilic phase on energetic aspects of biowaste composting process. *Energies* 14 (4), 1183.

Stanaszek-Tomal, E. 2021. Anti-smog building and civil engineering structures. *Processes* 9 (8), 1446.

Starke, J. R., Metze, T. A. P., Candel, J. J. L., Termeer, C. J. A. M. 2022. Conceptualizing controversies in the EU circular bioeconomy transition. *Ambio*, 1-12.

Subova, E., Sasakova, N., Zigo, F., Mindzakova, I., Vargova, M., Kachnic, J., Lakticova, K. V., 2021. Amendment of livestock manure with natural zeolite-clinoptilolite and its effect on decomposition processes during composting. *Agriculture-Basel* 11 (10), 980.

Tu, Z. N., Ren, X. N., Zhao, J. C., Awasthi, S. K., Wang, Q., Awasthi, M. K., Zhang, Z. Q., Li, R. H. 2019. Synergistic effects of biochar/microbial inoculation on the enhancement of pig manure composting. *Biochar* 1 (1), 127-137.

Vargas-García, M. C., Lopez, M. J., Suárez-Estrella, F., Moreno, J. 2009. Lignocellulolytic microorganisms from a composting habitat: current and future prospects. *Composting: Processing, Materials and Approaches*, 269-294.

Villar. I., Alves, D., Garrido, J., Mato, S. 2016. Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. *Waste Management* 54, 83-92.

Vimercati, L., Baldassarre, A., Gatti, M. F., De María, L., Caputi, A., Dirosi, A. A., Cuccaro, F., Bellino, R. M. 2016. Respiratory health in waste collection and disposal workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (7), 631.

Wang, H. Y., Fan, B. Q., Hu, Q. X., Yin, Z. W. 2011. Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial community and maturity of compost. *Bioresource Technology* 102 (24), 11189-11193.

Wang, J. Q., Suzuki, T., Mori, T., Yin, R., Dohra, H., Kawagishi, H., Hirai, H. 2021. Transcriptomics analysis reveals the high biodegradation efficiency of white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 on native lignin. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 132 (3), 253-257.

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

Wojcieszak, D., Zaborowicz, M., Prybyl, J., Boniecki, P., Jedrus, A. 2021. Assessment of the content of dry matter and dry organic matter in compost with neural modelling methods. *Agriculture-Basel* 11 (4), 307.

Wu, D., Wei, Z. M., Mohamed, T. A., Zheng, G. R., Qu, F. T., Wang, F., Zhao, Y., Song, C. H. 2022. Lignocellulose biomass bioconversion during composting: mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere* 286 (1), 131635.

Wu, D., Wei, Z. M., Zhao, Y., Zhao X. Y., Mohamed, T. A., Zhu, L. J., Wu, J. Q., Meng, Q. Q., Yao, C. H., Zhao, R. 2019. Improved lignocellulose degradation efficiency based on Fenton pretreatment during rice straw composting. *Bioresource Technology* 294, 122132.

Xie, M. D., Guo, X., Liu, D. 2022. Leachate pretreatment before pipe transportation: reduction of leachate clogging potential and upgrading of landfill gas. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19 (10), 6349.

Yeh, C. K., Lin, C. T., Shen, H. C., Cheruiyot, N. K., Camarillo, M. E., Wang, C. L. 2020. Optimizing food waste composting parameters and evaluating heat generation. *Applied Sciences-Basel* 10 (7), 2284.

Yu, K. F., Sun, X. Y., Li, S. Y., Cai, L. L., Zhang, P. F., Kang, Y., Yu, Z. H., Tong, J., Wang, L. 2018. Application of quadratic regression orthogonal design to develop a composite inoculum for promoting lignocellulose degradation during green waste composting. *Waste Management* 79, 443-453.

Zhang, Z. C., Shah, A. M., Mohamed, H., Tsiklauri, N., Song, Y. D. 2021. Isolation and screening of microorganisms for the effective pretreatment of lignocellulosic agricultural wastes. *Biomed Research International* 2021, 5514745.

Zhao, Y., Lu, Q., Wei, Y. Q., Cui, H. Y., Zhang, X., Wang, X., Shan, S., Wei, Z. M. 2016. Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis. *Bioresource Technology* 219, 196-203.

Zheng, G. D., Wang, Y. W., Wang, X. K., Yang, J. X., Chen, T. B. 2018. Oxygen monitoring equipment for sewage-sludge composting and its application to aeration optimization. *Sensors* 18 (11), 4017.

Zhou, C., Liu, Z., Huang, Z. L., Yu, X. L., Ning, P. 2015. A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: addition of different inocula at three stages of composting. *Waste Management* 40, 38-43.

Zhou, X. L., Li, J. B., Zhang, J., Deng, F., Chen, Y. C., Zho, P., Li, D. 2022. Bioaugmentation mechanism on humic acid formation during composting of food waste. *Science of the Total Environment* (830), 154783.