



UNIVERSIDAD DE ALMERIA

---

**EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES  
CELULASA,  $\beta$ -GLUCOSIDASA Y AMILASA  
DURANTE EL COMPOSTAJE DE LODOS DE  
DEPURADORA Y RESTOS VEGETALES**

---

**Master en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria**

**Alumna:** Fernanda Elizabeth Guano Andrade

**Tutores:**

Joaquín Moreno Casco  
Francisca Suárez Estrella

**Convocatoria:** Junio, 2017

# ÍNDICE

|   |          |
|---|----------|
| <b>Agradecimientos</b> .....  | <b>1</b> |
| <b>Resumen</b> .....  | <b>2</b> |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>3</b> |
| <b>1. Introducción</b> .....  | <b>4</b> |
| 1.1. Compostaje de residuos .....                                       | 5        |
| 1.1.1. Materias primas .....  | 6        |
| 1.1.1.1. Lodos.....   | 6        |
| 1.1.1.2. Residuos vegetales .....                                       | 7        |
| 1.1.2. El proceso de compostaje.....                                    | 7        |
| 1.1.3. Factores que afectan al proceso de compostaje.....               | 9        |
| 1.1.3.1. Temperatura .....  | 10       |
| 1.1.3.2. Humedad .....  | 10       |
| 1.1.3.3. pH.....  | 11       |
| 1.1.3.4. Aireación.....   | 11       |
| 1.1.3.5. Tamaño de la partícula .....                                   | 12       |
| 1.1.3.6. Relación C/N, C/P .....  | 12       |
| 1.2. Microbiota asociada al proceso de compostaje .....                 | 13       |
| 1.2.1. El proceso de compostaje desde el punto de vista microbiano..... | 14       |
| 1.3. Indicadores enzimáticos del proceso de compostaje.....             | 16       |
| 1.3.1. Actividad Celulasa .....   | 17       |
| 1.3.2. Actividad $\beta$ -Glucosidasa .....                             | 18       |
| 1.3.3. Actividad Amilasa.....   | 18       |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2. Objetivo .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3. Materiales y Métodos .....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1. Toma de muestras .....   | 20        |
| 3.2. Preparación de las muestras .....  | 24        |
| 3.3. Caracterización enzimática .....   | 26        |
| 3.3.1. Protocolo de análisis para cuantificar actividad celulasa en muestras de compost .....             | 26        |
| 3.3.2. Protocolo de análisis para cuantificar actividad $\beta$ -glucosidasa en muestras de compost ..... | 28        |
| 3.3.3. Protocolo de análisis para cuantificar actividad amilasa en muestras de compost .....              | 29        |
| 3.4. Análisis estadístico.....  | 30        |
| <b>4. Resultados y Discusión .....</b>  | <b>31</b> |
| 4.1. Cuantificación de actividad Celulasa a lo largo del proceso de compostaje .....                      | 31        |
| 4.2. Cuantificación de actividad $\beta$ -glucosidasa a lo largo del proceso de compostaje.....           | 38        |
| 4.3. Cuantificación de actividad Amilasa a lo largo del proceso de compostaje.....                        | 45        |
| <b>5. Conclusiones.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>6. Bibliografía.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>7. Anexos.....</b>   | <b>62</b> |
| 7.1. Anexo 1: Reactivos Celulasa .....  | 62        |
| 7.2. Anexo 2: Reactivos $\beta$ -glucosidasa .....  | 65        |
| 7.3. Anexo 3: Reactivos Amilasa.....  | 67        |

## ÍNDICE TABLAS

**Tabla 3.1.** Plantas de compostaje a partir de las cuales se llevó a cabo la toma de muestras. .... 23

**Tabla 3.2.** Nomenclatura utilizada para nombrar las distintas plantas de compostaje muestreadas. .... 25

## ÍNDICE FIGURAS

**Figura 1.1.** Recogida y acopio de residuos vegetales. .... 5

**Figura 1.2.** Etapas del proceso de compostaje (Moreno & Moral, 2008). .... 9

**Figura 3.1.** Robot multifuncional de cuchillas (Marca: Moulinex, Marca: Innovation)..... 24

**Figura 3.2.** Envasadora de vacío (Marca: FOODSAVER, Modelo: FFS002X) y muestras conservadas a vacío y congelación. .... 25

**Figura 3.3.** Espectrofotómetro Biotek (Modelo: Eon) para medida de la actividad enzimática. .... 27

**Figura 4.1.** Actividad enzimática celulasa en plantas de compostaje de lodos..... 32

**Figura 4.2.** Análisis estadístico de la actividad celulasa en plantas de compostaje de lodos. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un 95.0 % de nivel de confianza. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje con respecto a las plantas de lodos analizadas para actividad celulasa. .... 34

**Figura 4.3.** Actividad enzimática celulasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. .... 36

**Figura 4.4.** Análisis estadístico de la actividad celulasa en plantas de compostaje de restos vegetales. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un 95.0 % de nivel de confianza. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje con respecto a las plantas de restos vegetales analizadas para actividad celulasa. .... 37

**Figura 4.5.** Actividad enzimática  $\beta$ -glucosidasa en plantas de compostaje de lodos..... 39

**Figura 4.6.** Análisis estadístico de actividad  $\beta$ -glucosidasa en plantas de compostaje de lodos. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un nivel confianza del 95.0 %. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje y las distintas plantas analizadas para actividad  $\beta$ -glucosidasa. .... 41

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.7.</b> Actividad enzimática $\beta$ -glucosidasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. ....  | 43 |
| <b>Figura 4.8.</b> Análisis estadístico de actividad $\beta$ -glucosidasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. <b>A.</b> Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. <b>B.</b> Gráfico de medias, y test de múltiple comparación a un nivel del 95.0 % de confianza. <b>C.</b> Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje y las plantas analizadas para actividad $\beta$ -glucosidasa. ....   | 45 |
| <b>Figura 4.9.</b> Actividad enzimática amilasa en plantas de compostaje de lodos. ....  | 47 |
| <b>Figura 4.10.</b> Análisis estadístico de actividad amilasa en plantas de compostaje de lodos. <b>A.</b> Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. <b>B.</b> Gráfico de medias, test de comparación múltiple a un 95.0 % de nivel de confianza. <b>C.</b> Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje y las plantas analizadas para actividad amilasa. ....  | 48 |
| <b>Figura 4.11.</b> Actividad enzimática amilasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. ....  | 49 |
| <b>Figura 4.12.</b> Análisis estadístico de actividad amilasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. <b>A.</b> Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. <b>B.</b> Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un nivel confianza del 95.0 %. <b>C.</b> Gráfico de interacciones entre las distintas fases del compostaje y las plantas analizadas para actividad amilasa. ....  | 51 |
| <b>Figura 4.13.</b> Análisis estadístico comparativo de actividad enzimática en plantas de compostaje de lodos y residuos vegetales. <b>A, C &amp; E.</b> Gráficos de medias para celulasa, $\beta$ -glucosidasa y amilasa respectivamente, y test de comparación múltiple a un nivel de confianza del 95.0 %. <b>B, D &amp; F.</b> Gráficos de interacciones entre muestreo y materia prima empleada en cada planta de compostaje analizada, para actividad enzimática celulasa, $\beta$ -glucosidasa y amilasa respectivamente. .... | 55 |

## **Agradecimientos**

Al Dr. Joaquín Moreno y a la Dra. Francisca Suárez por el apoyo científico brindado en este estudio, por la oportunidad de colaborar y ampliar mis conocimientos en la principal línea de investigación que manejan como equipo de trabajo.

A María José Estrella, gracias por su paciencia y apoyo, hubiera sido imposible realizar este trabajo sin ti, a pesar del corto tiempo que compartimos me enseñaste que si haces lo que te gusta las cosas no cuestan nada.

El camino ha sido difícil pero siempre he contado con mi familia para salir adelante, mis padres Janeth y Aníbal han sido mi apoyo incondicional, me enseñaron el valor y la importancia de las cosas y con su amor incondicional todo fue más fácil, de igual manera a Isabel y Ramiro, que con un simple mensaje cambiaban mi día.

A mi hermana, Verito por ser un ejemplo para mí, a pesar de ser más pequeña, ella me enseña cada día que la perseverancia te lleva a lograr metas que se ven inalcanzables.

A mi esposo, lo mejor de mi vida, Marlon, por ser un pilar fundamental para mí, hemos logrado juntos una meta que hace unos años se veía tan lejana, esto te lo debo a ti, tú eres el que alegró mis días tristes, él que sin darme cuenta estaba ahí para darme la mano y ayudarme a seguir adelante, gracias mi amor por compartir este sueño conmigo, por tu paciencia y comprensión, por los momentos de risa y llanto, y sobre todo por tu amor incondicional. Al final lo logramos mi amor, resistir, persistir y nunca desistir. ¡Vamos por más!

*“El éxito no proviene del reconocimiento ajeno. Es el resultado de lo que sembraste con amor” (Paulo Coelho).*

***Fernanda Elizabeth Guano Andrade.***

## Resumen

El compostaje es una de las tecnologías más eficaces, económicas y respetuosas con el medio ambiente, que se utiliza para el tratamiento de residuos orgánicos generados por actividades antropogénicas. El compostaje se considera un proceso dinámico, biológico, aerobio y termófilo, en el que influyen factores como las materias primas, la población microbiana inicial y las condiciones operacionales. El objetivo de este estudio fue la caracterización, desde el punto de vista cuantitativo, de las actividades celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa durante las distintas fases que se suceden en procesos de compostaje de lodos y residuos vegetales.

Las muestras de compost fueron analizadas en relación con las actividades antes mencionadas. La celulasa se cuantificó en extractos líquidos, utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato enzimático y determinando espectrofotométricamente cantidad de glucosa liberada. La  $\beta$ -glucosidasa se cuantificó mediante la estimación colorimétrica del p-Nitrofenol (pNP) formado por la hidrólisis del p-Nitrofenil- $\beta$ -D-Glucopiranosido (pNPG). La amilasa se determinó con una solución de almidón como sustrato y posterior cuantificación de azúcares liberados.

Las plantas de compostaje muestreadas para tal fin, basan su principal actividad en el tratamiento de lodos de depuradora (L1, L2 y L3) o de restos vegetales (RV1, RV2 y RV3). Los materiales de la planta denominada L1, mostraron una mayor actividad celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa al inicio del proceso, con valores de 1,8356, 30,3662 y 0,7107  $\mu\text{mol/g h}$ , respectivamente. En términos generales, al final del proceso, estos valores disminuyeron considerablemente. En los residuos vegetales, la planta denominada RV2 mostró una mayor

actividad celulasa y  $\beta$ -glucosidasa al inicio del proceso con valores de 7,0832 y 18,7742  $\mu\text{mol/g h}$ , respectivamente. Al igual que en el caso de las plantas cuyas materias primas eran lodos de depuradora, al final del proceso, estos valores iniciales disminuyeron considerablemente.

Las actividades celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa, en general presentaron una evolución similar tanto en lodos como en residuos vegetales, de modo que al inicio del proceso se obtuvieron los valores más elevados de actividad, y fueron disminuyendo conforme el proceso avanzaba hacia la fase de maduración.

De acuerdo con los resultados, se puede concluir que la naturaleza de la materia prima, los factores operaciones y la temperatura, influyeron significativamente en la evolución de las actividades enzimáticas estudiadas a lo largo del proceso de compostaje. No obstante, hay que destacar que la evolución de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en ambos tipos de plantas fue muy similar, lo que implica que dicho parámetro enzimático podría considerarse como un indicador general de la evolución del proceso de compostaje, independientemente de las materias primas de partida.

## **Abstract**

Composting is one of the most efficient, economical and environmentally friendly technologies used for the treatment of organic waste generated by anthropogenic activities.

Composting is considered a dynamic, biological, aerobic and thermophilic process, mainly influenced by factors such as raw materials, the initial microbial population and operational conditions affect the process. The objective of this study was the quantitative characterization



of the cellulase,  $\beta$ -glucosidase and amylase activities during the different phases that occur in composting process of sludge and vegetable residues.

Compost samples were analyzed in relation to the above activities; cellulase was quantified in liquid extracts with the carboxymethylcellulose (CMC) to determine the released glucose.  $\beta$ -glucosidase was carried out by the colorimetric estimation of p-Nitrophenol (pNP) formed by the hydrolysis of p-Nitrophenyl-glucopiranoside (pNPG). Finally, amylase was determined with a solution of starch and toluene for the determination of released sugars.

In relation to sludge, L1 plant showed a higher cellulase,  $\beta$ -glucosidase and amylase activities at the beginning of the process with values of 1,8356, 30,3662 and 0,7107  $\mu\text{mol} / \text{g h}$ , respectively. In general terms, at the end of the process, those activities decreased considerably. Plant RV2 showed the highest cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities at the beginning of the process, with values of 7,0832 and 18,7742  $\mu\text{mol} / \text{g h}$ , respectively. Similar to sewage sludge based-plants, at the end of the composting processes in vegetable waste based-plants, enzymatic activities decreased considerably.

According to the results, the nature of the raw material, operational factors and temperature influenced enzymatic activities and evolution of the composting process. However, it should be noted that the evolution of  $\beta$ -glucosidase activity in both types of plants was very similar, implying that this enzymatic parameter could be considered as a general indicator of the evolution of the composting process, regardless of the starting raw materials.

## **1. Introducción**

## 1.1. Compostaje de residuos

El compostaje es una de las tecnologías más eficaces, económicas y respetuosas con el medio ambiente, que hoy día se utilizan para el tratamiento de los residuos orgánicos generados por actividades antropogénicas (Figura 1.1). Durante muchos siglos ha sido utilizado como un medio de recuperación de la materia orgánica para su posterior incorporación de nuevo al suelo. El compostaje es un proceso natural que transforma la materia orgánica en un compuesto humificado y biológicamente estable. Debido a sus características físicas, químicas y microbiológicas, el uso adecuado del compost, contribuye a mejorar la estructura, porosidad y grado de compactación de los suelos, gracias a que incrementa la capacidad de retención de agua y de intercambio catiónico en los mismos (Cooperband, 2000).



**Figura 1.1.**  
acopio de  
vegetales.

Recogida y  
residuos

El compostaje se considera un proceso dinámico, biológico, aerobio y termófilo, en cuya evolución influyen factores tales como las materias primas, la población microbiana inicial y las condiciones operacionales predominantes. Para que se lleve a cabo el proceso de

compostaje de forma adecuada, la población microbiana autóctona debe contar con los nutrientes necesarios, biopolímeros, agua y oxígeno para su crecimiento; de esta forma el proceso evolucionará de forma adecuada, se reducirán al mínimo las emisiones, pérdidas de nutrientes y el producto final que se obtenga será estable, almacenable, transportable y potencialmente aplicable en suelo (Moreno y Moral, 2008).

### **1.1.1. Materias primas**

#### **1.1.1.1. Lodos**

Los lodos de depuradora se forman durante el tratamiento mecánico, biológico y químico de aguas residuales. En la mayoría de los casos, el contenido de lodos no supera el 2% del volumen de aguas residuales de los efluentes. Es un residuo rico en materia orgánica, nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, azufre y otros microelementos necesarios para que las plantas y la microbiota del suelo se desarrolle. Sin embargo, los lodos pueden contener compuestos tóxicos (metales pesados, plaguicidas) y organismos patógenos (bacterias, hongos, parásitos), que podrían ser neutralizados mediante compostaje. Por otro lado, dicho proceso permitiría la estabilización de la materia orgánica, el secado de los lodos y la obtención de un material que puede ser reutilizado para la fertilización de suelos agrícolas (Ksobucki *et al.*, 2000).

El compostaje de lodos de depuradora implica que éstos se deben mezclar con materiales acondicionantes en una proporción adecuada para obtener una relación C/N de aproximadamente 30:1. Los acondicionantes más utilizados contienen celulosa como es el caso de las virutas de madera, aserrín, corteza de árboles, paja, hojarasca, de modo que la

mezcla equilibra bien el contenido en agua, la relación C/N, y permite mejorar la aireación de la mezcla (Ksobucki *et al.*, 2000).

#### **1.1.1.2. Residuos vegetales**

Para la elaboración de un compost de calidad es deseable que el residuo presente un alto contenido en materia orgánica. Los residuos vegetales están formados por tallos, fibras, cutículas, cáscaras, bagazos, rastrojos, restos de podas, frutas, etc., procedentes de diversas especies cultivadas. La incorporación de estos residuos compostados al suelo contribuye a incrementar la materia orgánica del mismo, y a la modificación de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Es importante conocer la composición química y la relación carbono/nitrógeno del residuo vegetal que se va a compostar (Sztern *et al.*, 1999) ya que de ello dependerá el éxito del proceso y, en consecuencia, la calidad del producto final.

#### **1.1.2. El proceso de compostaje**

La descomposición de la materia orgánica en un proceso de compostaje se atribuye a la acción de los microorganismos presentes en los propios residuos que, bajo condiciones de humedad moderada y a diferentes temperaturas, oxidan los materiales orgánicos. Gracias a esta actividad microbiana se liberan grandes cantidades de energía, lo que va a provocar las fluctuaciones típicas de temperatura que ocurren en un proceso de compostaje (Moreno y Moral, 2008).

En el proceso de compostaje se distinguen las siguientes fases térmicas (Figura 1.2):

**Fase de preparación:** acondicionamiento de los residuos. En ella se mezclan los materiales de partida para regular su contenido de agua, el tamaño de partícula, eliminar los elementos no transformables y obtener una relación C/N adecuada (Álvarez, 2003).

**Fase mesófila:** durante esta fase la temperatura asciende desde la ambiental hasta aproximadamente 40 °C. Se produce la degradación de los azúcares más simples y aminoácidos por la acción de la microbiota mesófila; la relación C/N juega un papel importante en esta etapa puesto que el carbono aportará la energía a los microorganismos para su multiplicación y el nitrógeno es esencial para la síntesis de nuevas moléculas. La humedad debe mantenerse en torno al 40-60%, puesto que es esencial para la actividad microbiana y contribuye al reparto de los nutrientes en la pila de compostaje (Álvarez, 2003).

**Fase termófila:** se produce un incremento progresivo de la temperatura que puede llegar a superar los 60 °C. Durante esta fase ocurre la degradación de polímeros como la celulosa y hemicelulosa, debido a la actividad enzimática propia de las poblaciones de bacterias y hongos termotolerantes y termófilos extremos. Gracias a que se alcanzan altas temperaturas se produce la esterilización del material que se encuentra en la pila de compostaje, de modo que la mayoría de semillas y patógenos humanos y vegetales son eliminados (Álvarez, 2003). El control, tanto de la humedad como de los niveles de oxígeno en el interior de la pila de compostaje, es esencial para que la población microbiana actúe de forma adecuada (Álvarez, 2003).

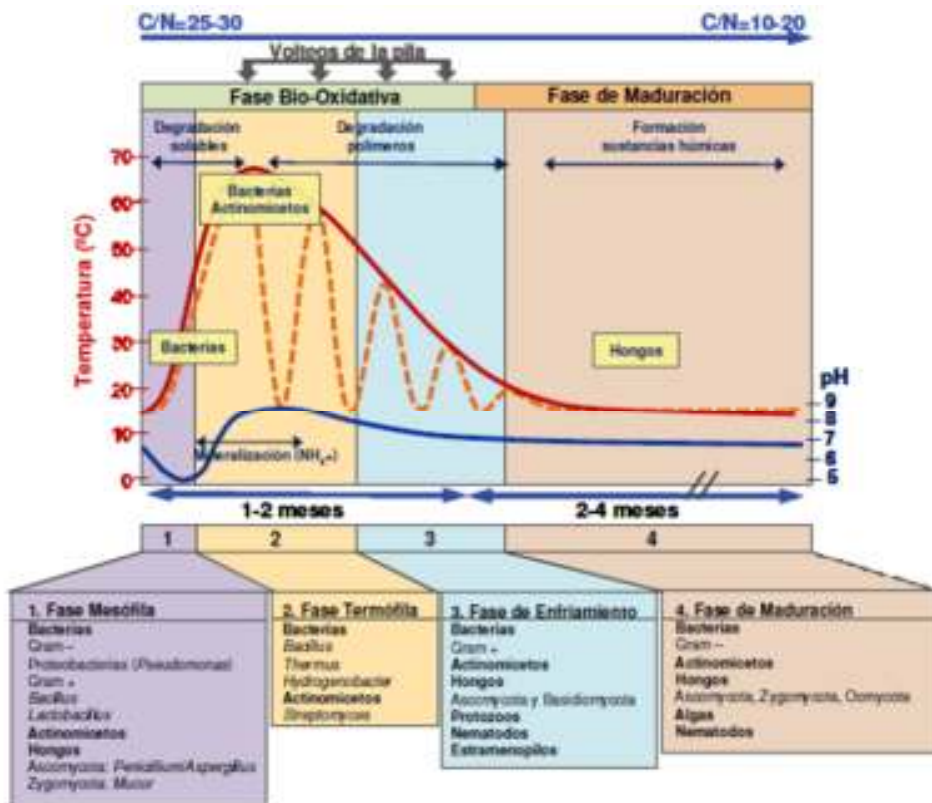
**Fase de enfriamiento:** la temperatura empieza a disminuir paulatinamente hasta alcanzar la temperatura ambiental. Durante esta fase se sigue produciendo degradación de celulosa y lignina por parte de bacterias y hongos (Álvarez, 2003).

**Fase de maduración y producto final:** durante esta fase ocurre la estabilización de la temperatura y el pH, y se inicia el proceso de formación de ácidos húmicos y fúlvicos. El producto final debe ser estable desde un punto de vista microbiano, presentar un color negro o marrón oscuro, con olor a tierra, y además los materiales iniciales alcanzan un grado de descomposición elevado (Álvarez, 2003).

Figura 1.2. Etapas del proceso de compostaje (Moreno y Moral, 2008).

### 1.1.3. Factores que afectan al proceso de compostaje

Las variables más importantes que afectan al compostaje se pueden clasificar en Parámetros de



Seguimiento, los cuales son controlados durante todo el proceso y corregidos para que los valores se encuentren en los intervalos adecuados para cada fase. Por otro lado, se conocen los Parámetros Relativos a la naturaleza del sustrato, los cuales son medidos y adecuados al inicio del proceso. Entre los parámetros de seguimiento se encuentran temperatura, humedad, pH y aireación y entre los parámetros relativos se encuentran aquellos relacionados con el tamaño de la partícula, relación C/N, C/P, materia orgánica y conductividad eléctrica.

### **1.1.3.1. Temperatura**

La temperatura es un parámetro determinante en el proceso de compostaje, debido a que a partir de ésta se puede estimar la eficiencia y el grado de estabilización alcanzados en el proceso. Puesto que existe una relación directa entre la temperatura y la magnitud de la degradación de la materia orgánica, también es indicador de la actividad microbiana. Cada microorganismo requiere de un intervalo de temperatura óptimo en el que su actividad metabólica es más eficiente, estando éste para microorganismos mesófilos entre 15 y 40 °C y para microorganismos termófilos entre 40 y 70 °C. Los propios microorganismos, al degradar la materia orgánica del residuo producen la liberación de energía en forma de calor, lo que va a provocar una variación de la temperatura en la pila de compostaje (Liang *et al.*, 2003).

### **1.1.3.2. Humedad**

La presencia de agua a lo largo de un proceso de compostaje es imprescindible para que se desarrolle la actividad microbiana de forma adecuada. La humedad óptima para el crecimiento microbiano se encuentra entre el 50 y el 70%. La actividad biológica decrece mucho cuando la humedad está por debajo del 30%, mientras que por encima del 70% el agua desplaza al aire en los espacios libres existentes entre las partículas, reduciendo la transferencia de oxígeno y de esta forma se produce anaerobiosis. El contenido de humedad dependerá de las materias primas empleadas en el proceso. Por ejemplo, para materiales fibrosos o residuos forestales gruesos la humedad se encuentra alrededor del 75-85%, mientras que para material vegetal fresco oscila entre el 50 y el 60% (Haug, 1993).

### **1.1.3.3. pH**

El pH influye en el proceso de compostaje por su acción sobre los microorganismos. Los hongos toleran un pH entre 5 y 8, mientras que las bacterias tienen menor capacidad de tolerancia, desarrollándose mejor a pH entre 6 y 7,5. Estos valores de pH coinciden con el intervalo observado a lo largo del proceso, lo que permite la existencia de grupos microbianos muy diversos. Durante la fase mesófila se observa una disminución del pH como consecuencia de la acción de los microorganismos sobre la materia orgánica inicial, y la liberación de ácidos orgánicos; durante la fase termófila el pH sube por encima de 8 y empieza a estabilizarse. Conforme avanza el proceso, la generación de amoníaco procedente de la descomposición de las proteínas, provoca una progresiva alcalinización del medio en la fase de enfriamiento. Finalmente, en la fase de maduración, el pH tiende a la neutralidad debido a la formación de compuestos húmicos (Sánchez-Monedero *et al.*, 2001; Sundberg *et al.*, 2004).

### **1.1.3.4. Aireación**

La aireación es una variable operacional muy importante y la que más incide en la actividad microbiana. Debido a que el proceso de compostaje se desarrolla bajo condiciones de aerobiosis, el material presenta porcentajes variables de oxígeno en sus espacios libres. La parte más externa contiene una concentración de oxígeno similar a la ambiental, la cual va disminuyendo hacia el interior de la pila, mientras que el de dióxido de carbono va aumentando. Una mala aireación provoca una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, lo que provoca una disminución en los niveles de descomposición de la



materia orgánica, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores (Kulcu *et al.*, 2004).

#### **1.1.3.5. Tamaño de la partícula**

El tamaño de las partículas que componen la materia a compostar es una variable que afecta directamente al proceso de compostaje, puesto que cuanto mayor es la superficie expuesta al ataque microbiano por unidad de masa, más rápida será la degradación. Por lo tanto, la trituración del material facilita el ataque de los microorganismos. Un tamaño de partícula relativamente pequeño provoca una mayor superficie de contacto para el ataque microbiano, pero si es excesivamente pequeño, también se reduce el espacio entre partículas y aumentan las fuerzas de fricción, limitando la difusión de oxígeno hacia el interior y la salida de dióxido de carbono hacia el exterior, provocando una disminución de la actividad microbiana. Las dimensiones de partícula consideradas óptimas pueden variar entre 1 y 5 cm (Haug, 1993).

#### **1.1.3.6. Relación C/N, C/P**

El carbono y el nitrógeno son los dos constituyentes básicos de la materia orgánica, por esta razón para obtener un compost de buena calidad es importante que exista una relación equilibrada entre ambos elementos. Los microorganismos, generalmente, utilizan 30 partes de carbono por una de nitrógeno, por lo que la relación C/N óptima para un proceso de compostaje evolucione de forma adecuada se considera de 25 a 35. La relación C/N es un factor que influye en la pérdida de amonio y en la velocidad del proceso; si la relación C/N es mayor de 40 la actividad de los microorganismos disminuye debido a que deben oxidar el carbono en exceso, y además existe un déficit de nitrógeno para llevar a cabo la síntesis proteica. Si el residuo a compostar presenta una relación C/N alta, pero la materia orgánica

es poco biodegradable, el proceso tendrá lugar lentamente y afectará solo a una proporción de la masa total, y si la relación C/N es muy baja el compostaje será más rápido y el exceso de nitrógeno se desprenderá en forma de amoníaco. La relación C/N ideal en el producto final está en torno a 10, similar al humus, sin embargo se suele considerar que un compost se ha estabilizado cuando la relación C/N es menor a 20 (Moreno y Moral, 2008).

Por otro lado, el fósforo está presente en cantidades mínimas para que el proceso se lleve a cabo correctamente, por tanto una adecuada relación entre los nutrientes principales permite un adecuado crecimiento de la microbiota asociada al proceso. La relación C/P durante el proceso de compostaje varía entre 5 y 150, mientras que la relación N/P varía entre 5 y 20 (Moreno y Moral, 2008).

## **1.2. Microbiota asociada al proceso de compostaje**

Desde el punto de vista ecológico, el compostaje es un proceso dinámico debido a la actividad combinada de una amplia variedad de poblaciones microbianas, incluyendo bacterias, actinobacterias y hongos, que están vinculadas a condiciones ambientales y nutricionales. Sin embargo, la temperatura y los nutrientes en el interior de las pilas son dos de los factores más decisivos en la evolución de la diversidad microbiana durante el proceso de compostaje. Los microorganismos juegan un papel clave en todos los eventos relacionados con la biotransformación de sustratos orgánicos, siendo las bacterias las más influyentes debido a su versatilidad metabólica. Las bacterias se encuentran distribuidas por toda la pila de compost, mientras que los hongos y actinobacterias están situados de forma más superficial, aproximadamente a 5-15 cm de la superficie, dándole el típico aspecto grisáceo característico de las pilas (López *et al.*, 2015).

Las bacterias identificadas en el proceso de compostaje incluyen diversas especies incluidas en los siguientes grupos: Bacilos gram positivos, Clostridios, especies del *Phylum* Bacteroidetes, Proteobacterias, Actinobacterias y los géneros *Hydrogenobacter* y *Thermus*. Los géneros bacterianos frecuentemente detectados son *Bacillus*, *Pseudomonas* y el actinomiceto *Streptomyces*. En el compostaje solo se han detectado arqueas anaerobias productoras de metano cuya presencia puede estar relacionada con la formación de microambientes anaeróbicos en el seno de la pila de compostaje. Los hongos y levaduras típicos del compostaje pertenecen a las clases Ascomycetes, Zygomycetes, Basidiomycetes, Saccharomycetes y Ureidiomycetes. Los géneros fúngicos frecuentemente detectados son *Aspergillus* y *Penicillium*, seguidos de los géneros *Mucor*, *Acremonium*, *Mortierella*, *Fusarium*, *Chaetomium* y *Scopulariopsis*, mientras que las levaduras detectadas corresponden a los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Moreno y Moral, 2008).

### **1.2.1. El proceso de compostaje desde el punto de vista microbiano**

A continuación, se indican las diferentes etapas del proceso de compostaje teniendo en cuenta la comunidad microbiana predominante en cada caso.

**Fase de preparación:** en los componentes iniciales la microbiota es muy variada, puesto que depende de factores como el sustrato y las condiciones de almacenamiento de la materia prima. En general, la microbiota que predomina en esta etapa se corresponde con la microbiota natural o indígena de los materiales (Moreno y Moral, 2008).

**Fase mesófila:** los sustratos se encuentran a temperatura ambiente y comienzan a actuar bacterias y hongos mesófilos y termotolerantes, que degradan rápidamente polímeros carbonatados de cadena sencilla (azúcares). Las bacterias con metabolismo oxidativo y fermentativo son las que alcanzan mayores niveles en esta fase, principalmente bacterias gram negativas y productoras de ácido láctico. Hay que mencionar que en esta etapa la cantidad de especies fúngicas es baja respecto a la de especies bacterianas, puesto que el tiempo de generación bacteriano es mucho más corto. Las bacterias descritas en esta fase pertenecen a distintas familias como *Alcaligenaceae*, *Alteromonadaceae*, *Bacillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Clostridiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Methylobacteriaceae*. El género bacteriano predominante en esta etapa es *Bacillus*. Entre los géneros fúngicos se puede mencionar a *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Backusella*, *Ulocladium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* y *Geotrichum*. En esta etapa predominan las actinobacterias de la familia *Nocardiaceae* (Hansgate *et al.*, 2005).

**Fase termófila:** en esta etapa proliferan microorganismos termófilos tales como actinomicetos del género *Thermoactinomyces*, diversos *Bacillus spp.*, y bacterias gram negativas como *Thermus* e *Hydrogenobacter*. Al inicio de esta fase los nutrientes fácilmente asimilables han sido consumidos, por lo que la microbiota termófila y termotolerante inicia la metabolización de proteínas, incrementando la liberación de amoníaco con la consiguiente alcalinización del medio. También se metabolizan polímeros como la lignocelulosa y como consecuencia de esta degradación se liberan nuevas moléculas que pueden ser utilizadas por otros microorganismos. Las bacterias que predominan cuando la temperatura alcanza valores

de 50 a 60 °C o incluso superiores son bacterias esporuladas como *Bacillus spp.* y no esporuladas como *Hydrogenobacter spp.* y *Thermus spp.* (Moreno y Moral, 2008).

**Fase de enfriamiento y maduración:** durante esta etapa existe una proliferación de la microbiota mesófila distinta a la de la etapa inicial, o aquella termotolerante que ha sobrevivido a las altas temperaturas del proceso. Predominan hongos y actinomicetos capaces de degradar compuestos complejos. Los microorganismos que recolonizan el material degradado pueden provenir del entorno circundante o de la germinación de esporas preexistentes. Estas bacterias no sólo están implicadas en la degradación de la materia orgánica, también están involucrados en la oxidación de hidrógeno, amonio, nitrito y sulfuros, en la fijación de nitrógeno, reducción de sulfatos o la producción de exopolisacáridos. Uno de los microorganismos típicamente encontrados conforme avanza la maduración es el actinomiceto *Arthrobacter*. Conforme avanzan las fases finales del proceso, además de hongos y bacterias se pueden encontrar también organismos como protozoos, nematodos y miriápodos (Moreno y Moral, 2008).

### **1.3. Indicadores enzimáticos del proceso de compostaje**

La eficiencia del compostaje como proceso biodegradativo depende de la composición de la biomasa microbiana y de su actividad metabólica (Mondini *et al.*, 2004; Piotrowska-Cyplik *et al.*, 2009). Diversas enzimas microbianas controlan la tasa en la que los sustratos son degradados. Por ello, la caracterización y cuantificación de las actividades enzimáticas durante el compostaje puede reflejar la dinámica del proceso en lo que respecta a la degradación de la materia orgánica, proporcionando una información muy valiosa acerca de

la estabilidad y madurez del compost obtenido. Las principales enzimas implicadas en la biotransformación de la materia orgánica durante el compostaje de residuos hortícolas, pueden diferenciarse en función del elemento en cuyo ciclo están implicadas, teniendo en cuenta los tres ciclos que mayor movilidad y trascendencia presentan durante el compostaje: Carbono, Nitrógeno y Fósforo.

A continuación se indican los aspectos de 3 de las actividades enzimáticas más relevantes en procesos de compostaje: celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa.

### **1.3.1. Actividad Celulasa**

Las celulasas son las enzimas más diversas que catalizan una sola reacción, que es la hidrólisis del enlace  $\beta$  1,4 de la celulosa dando lugar a monómeros de glucosa. Existen al menos once familias de celulasas basadas en las similitudes de su secuencia de aminoácidos. La diversidad de las celulasas puede resultar de la extrema diversidad de sus sustratos naturales, las paredes celulares de las plantas. Las celulasas son muy diferentes de la mayoría de las enzimas, ya que degradan un sustrato insoluble. Esto requiere que la enzima se difunda al sustrato y luego transfiera un segmento de una molécula de celulosa de la partícula insoluble a su sitio activo, mientras que los sustratos solubles se difunden a la enzima y se unen al sitio activo por sí mismos (Wilson, 2011).

La fase inicial del compostaje se produce a temperaturas moderadas y es llevada a cabo tanto por bacterias como por hongos, luego se produce el aumento de temperatura y las bacterias termófilas dominan la comunidad. La degradación de la celulosa ocurre principalmente en la fase termófila, la comunidad de microorganismos en el compost es extremadamente diversa y muy variable, aunque el compost maduro tiende a tener comunidades más simples formadas de bacterias celulolíticas (Wilson, 2011).

### 1.3.2. Actividad $\beta$ -Glucosidasa

Debido a la gran variedad de enlaces glicosídicos existe una amplia gama de enzimas que se conocen como glucosidasas, las cuales catalizan la hidrólisis de diversos glicósidos. Esta diversidad de enzimas se debe a los diferentes sustratos que se encuentran en la naturaleza y también a la diferente solución evolutiva al problema de construir sitios activos capaces de hidrolizar enlaces glicosídicos; por lo tanto, las glucosidasas usualmente se denominan de acuerdo con el material o sustrato que hidrolizan, por ejemplo, la  $\alpha$ -glucosidasa (maltasa) cataliza la hidrólisis de  $\alpha$ -D-glucopiranosidos y  $\beta$ -glucosidasa (celobiasa) hidroliza maltosa y celobiosa. Para la degradación de materia orgánica, de celulosa a glucosa, hay tres enzimas clave, la endoglucanasa, celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa, entre éstas, la endoglucanasa actúa al azar, escindiendo enlaces beta dentro de la molécula de celulosa; la celobiohidrolasa elimina las unidades de celobiosa de los extremos de las cadenas celulósicas mientras tanto, las moléculas de celobiosa se escinden por  $\beta$ -glucosidasa, liberando glucosa en el proceso final de descomposición de celulosa. La  $\beta$ -glucosidasa es la enzima que actúa en la etapa final del proceso de descomposición de la celulosa por hidrolización del residuo celobiosa, por lo tanto, esta enzima libera azúcares simples al final del proceso que son posteriormente utilizados como fuente de energía (Ferraz *et al.*, 2015).

### 1.3.3. Actividad Amilasa

Las amilasas catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos de amilosa, amilopectina, y glucógeno para producir dextrina, oligosacáridos, maltosa y D-glucosa. Las tres principales enzimas amilolíticas son  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa y pululanasa, son producidas por diferentes tipos de microorganismos. Durante la degradación del almidón actúan diferentes

enzimas como la  $\alpha$ -amilasa que hidroliza los enlaces  $\alpha$  (1-4) de la amilosa y las  $\beta$ -amilasas que actúan sobre los extremos no reductores de la amilosa y la amilopectina, hidrolizando los enlaces glicosídicos alternantes. La pululanasa o isoamilasa hidroliza los enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1-6) liberando las ramificaciones de la amilopectina. El proceso de degradación del almidón genera moléculas de maltosa que son hidrolizadas por la maltasa para generar glucosa. Las  $\alpha$ -amilasas se producen fundamentalmente por bacterias termotolerantes del género *Bacillus*. Es importante mencionar que el alto contenido de compuestos orgánicos degradables en la materia prima inicial puede estimular el crecimiento microbiano y la síntesis enzimática. La producción de enzima depende de la biomasa microbiana, lo que implica que cuando la biomasa se degrada disminuye la actividad enzimática (Raut, 2008; Pascon, 2011).

## **2. Objetivo**

El Objetivo principal del presente Trabajo Fin de Máster es la caracterización, desde el punto de vista cuantitativo, de las actividades celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa durante las distintas fases que se suceden en procesos de compostaje de diversa naturaleza. Se pretende con ello, establecer diferencias y/o similitudes, a nivel enzimático, entre distintos procesos de compostaje, constituidos a base de lodos de depuradora y restos vegetales, bajo condiciones operacionales, en algunos casos, muy distintas.

## **3. Materiales y Métodos**

Para la realización de este Trabajo Fin de Máster fue necesario contactar con numerosas empresas expertas en la gestión de residuos orgánicos, con el objeto de obtener las materias primas. Una vez seleccionadas las empresas más apropiadas, se llevó a cabo la toma de



muestras, que posteriormente fueron transportadas al laboratorio y acondicionadas para análisis y conservación. Por cuestiones lógicas de confidencialidad, el nombre de las empresas implicadas se mantendrá en el anonimato.

### **3.1. Toma de muestras**

Las muestras fueron tomadas a partir de seis plantas de compostaje, tres de las cuales se dedican principalmente al tratamiento de lodos de depuradora, mientras que las tres restantes llevan a cabo compostaje de residuos vegetales. Para la recogida de las muestras se tuvieron en cuenta las distintas fases del proceso de compostaje: Materias Primas (MPR), Fase Mesófila (MES), Fase Termófila (TER), Fase de Enfriamiento (ENF), Fase de Maduración (MAD) y Producto Final (PRF), las cuales son consecuencia del perfil térmico mostrado durante el proceso. Durante el procedimiento de toma de muestra, se midió la temperatura del interior de las pilas con una sonda térmica, de modo que en cada fase del proceso, se comprobó que la temperatura coincidía con lo esperado para cada etapa. A continuación se indican las temperaturas esperadas en cada caso:

- Materias Primas (MPR): Temperatura ambiente
- Fase Mesófila (MES): 30-40 °C
- Fase Termófila (TER): 50-60 °C
- Fase de Enfriamiento (ENF): 30-40 °C
- Fase de Maduración (MAD): 20-30 °C
- Producto Final (PRF): Temperatura ambiente

A pesar de la dificultad que ello conlleva, principalmente debido al tamaño de las pilas, y con objeto de obtener muestras representativas de las condiciones existentes en cada momento, se fijaron nueve puntos de muestreo, considerando tres niveles posibles de profundidad, longitud y anchura, y combinándolos entre sí de modo que ninguno de ellos se repitiese en cada una de las zonas de muestreo establecidas. El material procedente de los nueve puntos fijados, fue mezclado y homogeneizado, dando lugar así a una única muestra compacta y uniforme, que posteriormente fue repartida en 3 submuestras o repeticiones.

En la Tabla 3.1, se muestra una breve descripción de las pilas de compostaje a partir de las cuales se llevó a cabo la toma de muestras teniendo en cuenta los materiales de partida, los factores operaciones (protocolos aplicados durante el proceso) así como la temperatura detectada en el momento de recoger la muestra en Fase Termófila.

| Planta de compostaje | Materia Prima       | Factores Operacionales  | Descripción Mezcla inicial   | Temperatura en Fase Termófila | Observaciones  |
|----------------------|---------------------|---|--|-------------------------------|--|
| <b>Planta 1</b>      | Lodos de depuradora | Volteo semanal  | Lodos de depuradora mezclados con restos vegetales en proporción 1:1 (v/v)   | 40 °C                         | No se alcanzaron temperaturas demasiado elevadas durante la Fase Termófila.  |
| <b>Planta 2</b>      | Lodos de depuradora | Volteo semanal  | Información no proporcionada por la empresa  | 40 °C                         | No se alcanzaron temperaturas demasiado elevadas durante la Fase Termófila.  |
| <b>Planta 3</b>      | Lodos de depuradora | Pilas en hileras localizadas en nave cubierta. Volteo continuo            | Lodos de depuradora desecados y mezclados con restos de poda en proporción 1:2 (v/v)   | 50 °C                         | No se alcanzaron temperaturas demasiado elevadas durante la Fase Termófila. Planta muestreada después de lluvias intensas; la planta estuvo cubierta, pero se paró el proceso.   |
| <b>Planta 4</b>      | Residuos Vegetales  | Volteo bajo demanda en función de la temperatura y necesidades de espacio | Mezcla de restos vegetales de plantas pepino, calabacín, y poda, que se van añadiendo a la pila conforme van llegando a la planta (proporción desconocida) | 70 °C                         | Durante la toma de muestra en maduración se observó que el material seguía biológicamente activo, por lo que probablemente se encontrase aún en fase biooxidativa.   |
| <b>Planta 5</b>      | Residuos Vegetales  | Volteo bajo demanda en función de la temperatura y necesidades de espacio | Mezcla de restos vegetales de plantas pepino, calabacín, y poda, que se van añadiendo a la pila conforme van llegando a la planta (proporción desconocida) | 40 °C                         | No se alcanzaron temperaturas demasiado elevadas durante la Fase Termófila. Durante la toma de muestra en maduración se observó que el material seguía biológicamente activo, por lo que probablemente se encontrase aún en fase biooxidativa. |

|                 |                    |   |  |       |  |
|-----------------|--------------------|---|--|-------|--|
| <b>Planta 6</b> | Residuos Vegetales | Volteo bajo demanda en función de la temperatura y necesidades de espacio | Mezcla de restos vegetales de plantas pimiento | 40 °C | No se alcanzan temperaturas muy demasiado elevadas durante la Fase Termófila. Durante la toma de muestra en maduración se ha observado que el material sigue activo, por lo que probablemente se encuentre aún en fase biooxidativa. |
|-----------------|--------------------|---|--|-------|--|

**Tabla 3.1.** Plantas de compostaje a partir de las cuales se llevó a cabo la toma de muestras.

### 3.2. Preparación de las muestras

Una vez que las muestras fueron tomadas en cada planta de compostaje, se transportaron al laboratorio, donde fueron trituradas y homogenizadas. Para el triturado de las mismas se utilizó un robot multifuncional de cuchillas (Marca: Moulinex, Modelo: Innovation, Figura 3.1.).



**Figura 3.1.** Robot multifuncional de cuchillas (Marca: Moulinex, Marca: Innovation)

El material se dividió en 3 submuestras y se introdujo en bolsas de vacío a razón de 50 g por bolsa que fueron posteriormente selladas mediante una envasadora de vacío (Marca: FoodSaver, Modelo: FFS002X, Figura 3.2.) y conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la realización de los análisis enzimáticos.



**Figura 3.2.** Envasadora de vacío (Marca: FOODSAVER, Modelo: FFS002X) y muestras conservadas a vacío y congelación.

Las distintas plantas de compostaje que fueron muestreadas, se catalogaron y nombraron en función del orden cronológico en el que se llevó a cabo el muestreo y, lógicamente, en función de los materias primas predominantes en la mezcla de partida. A continuación se detalla la nomenclatura utilizada para cada una de las 6 plantas de compostaje muestreadas (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Nomenclatura utilizada para nombrar las distintas plantas de compostaje muestreadas.

| <b>Planta de compostaje</b> | <b>Materia prima</b> | <b>Código</b> |
|-----------------------------|----------------------|---------------|
| <b>Planta 1</b>             | Lodos de depuradora  | L1            |
| <b>Planta 2</b>             |                      | L2            |
| <b>Planta 3</b>             |                      | L3            |
| <b>Planta 4</b>             | Residuo vegetal      | RV1           |
| <b>Planta 5</b>             |                      | RV2           |
| <b>Planta 6</b>             |                      | RV3           |

### **3.3. Caracterización enzimática**

A partir de las muestras procedentes de cada uno de los procesos de compostaje indicados anteriormente se llevó a cabo la caracterización de las actividades Celulasa,  $\beta$ -Glucosidasa y Amilasa. El análisis enzimático se realizó por triplicado, de modo que teniendo en cuenta 6 tiempos de muestreo (MPR, MES, TER, ENF, MAD y PRF) se analizaron un total de 18 muestras por cada planta de compostaje.

#### **3.3.1. Protocolo de análisis para cuantificar actividad celulasa en muestras de compost**

La actividad celulasa en las muestras de compost se cuantificó en extractos líquidos siguiendo el protocolo descrito por Guisado (2008) y Libmond y Savoie (1993). Para ello se pesaron 5 gramos de muestra y se añadieron 20 mL de tampón fosfato 0,5M a pH 7,5. Las muestras se incubaron a 30 °C con agitación de 100 rpm durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las muestras se filtraron con un kitasato y el extracto obtenido se dividió en dos alícuotas. La primera de ellas se marcó como problema (P) y la otra como control de reacción (C), siendo ésta última inactivada térmicamente a 100 °C durante 5 minutos en baño maría.

A los tubos problema (P) y control (C) obtenidos previamente, se les añadió un 1 mL de solución sustrato al 1% de CMC (Ver preparación de reactivos en Anexo 1) y se incubaron a 37 °C durante 2 horas a 80 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se calentaron los tubos a 100 °C durante 5 minutos para detener la reacción. Una vez atemperadas las muestras, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos de vidrio (1 mL) y se incorporó un tubo como blanco (B) con 1 mL de agua destilada. A los tubos problema (P) y control (C) se les añadieron 3 mL de reactivo DNS (Ver preparación de reactivos en Anexo 1).

Se comprobó con papel indicador que el pH estaba en torno a la alcalinidad. Los tubos se sellaron con *parafilm* y se calentaron en baño maría a 100 °C, durante 5 minutos, las muestras se enfriaron hasta temperatura ambiente y la absorbancia de cada una se midió en espectrofotómetro (Marca: Biotek, Modelo: Eon) a una longitud de onda de 550 nm (Ver preparación de reactivos en Anexo 1).



**Figura 3.3.** Espectrofotómetro Biotek (Modelo: Eon) para medida de la actividad enzimática.

De forma paralela se preparó una curva patrón de glucosa a distintas concentraciones: 500  $\mu\text{g/mL}$ , 375  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$  y 0  $\mu\text{g/mL}$ . Los tubos de la curva patrón fueron tratados con 3 mL de reactivo DNS, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, y la absorbancia de cada concentración de glucosa se midió en espectrofotómetro (Marca: Biotek, Modelo: Eon) a una longitud de onda de 550 nm.



### **3.3.2. Protocolo de análisis para cuantificar actividad $\beta$ -glucosidasa en muestras de compost**

La actividad  $\beta$ -glucosidasa fue cuantificada de acuerdo a los métodos descritos por Tabatabai (1982), Eivazi y Tabatabai (1988) y García Izquierdo *et al.* (2003). A partir de cada submuestra, se tomó por duplicado 1 gramo de peso húmedo, diferenciando en cada tubo las muestras Problema (P) de las control (C). A todos los tubos se les añadieron 4 mL de tampón MUB-HCl pH6, y posteriormente 1 y 2 mL de agua destilada se incorporaron respectivamente a los tubos Problema y Control. A continuación, a los tubos tratados como Problema se les añadió 1 mL de solución pNPG (p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido 0,25 mM; ver preparación de reactivos en Anexo 2), se agitaron y se comprobó con papel tornasol que el pH estuviera en torno a 6. Los tubos P y C se incubaron a 37 °C en agitación de 120 rpm durante 1 hora. Para detener la reacción enzimática se colocaron las muestras en una bandeja con hielo y se añadió 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 2M y 4 mL de solución extractante THAM-NaOH, pH12. Los tubos se agitaron hasta que se desarrolló color amarillo. A partir de la mezcla anterior se transfirieron 2 mL a microtubos y se centrifugaron a 10.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. La absorbancia de cada muestra (Problemas y Controles) se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm (Ver preparación de reactivos en Anexo 2).

En paralelo, se preparó una curva patrón a concentraciones de pNP (p-nitrofenol) de 200  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL y 0  $\mu$ g/mL. Para evitar problemas debidos a las diferentes tonalidades de color entre muestras de distinta procedencia, fue necesario preparar una curva patrón para cada uno de los muestreos analizados. En este caso, se pesó 1 g de muestra por triplicado, a partir de las muestras correspondiente a las distintas etapas del proceso compostaje. A los tubos de la curva patrón se les añadieron 4 mL de tampón MUB-HCl pH6, 2 mL de agua

destilada al tubo 0 y 1 mL al resto. Después se incorporó 1 mL de la solución de pNP a las distintas concentraciones (25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ ) en los tubos correspondientes, se agitó el contenido y se incubó a 37 °C con agitación de 120 rpm durante 1 hora.

Para detener la reacción enzimática se colocaron los tubos en una bandeja con hielo y se añadió 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  2M y 4 mL de solución extractante, THAM-NaOH, pH12, se agitaron hasta que la mezcla desarrolló color amarillo. De la mezcla anterior se transfirieron 2 mL a eppendorf, los cuales se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La absorbancia de cada muestra (P y C) se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm (ver preparación de los reactivos en Anexo 2).

### **3.3.3. Protocolo de análisis para cuantificar actividad amilasa en muestras de compost**

La actividad amilasa se realizó de acuerdo a los métodos descritos por Mishra *et al.* (1979) y Pati y Sahu (2003). A partir de cada submuestra, se pesaron por duplicado 3 g de peso húmedo, los cuales fueron tratados como problema (P) y control (C), respectivamente. A ambas muestras se le añadieron 2 mL de tolueno y 6 mL de tampón fosfato 0,5M a pH 5,5. Posteriormente, a los tubos problema (P) se les incorporaron 6 mL de solución de sustrato (almidón al 1%), mientras que a los tubos control (C) sólo se les adicionaron 6 mL de agua destilada. Todos los tubos se incubaron a 35 °C con agitación de 100 rpm durante 24 horas. Para interrumpir la reacción enzimática los tubos se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, y transcurrido este tiempo se transfirió un volumen de 2 mL a microtubos, los cuales se centrifugaron a 10.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos limpios (1 mL), y al blanco se le incorporó 1 mL de agua destilada. A cada tubo se le adicionaron 3 mL del reactivo DNS, los tubos se cubrieron con parafilm y fueron calentados a 100 °C en baño maría

durante un máximo de 15 minutos, hasta desarrollarse viraje de color del reactivo DNS a rojo-marrón oscuro (presencia de azúcares reductores libres). La absorbancia de cada muestra (P y C) se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm (ver preparación de los reactivos en Anexo 3).

De forma paralela se preparó una curva patrón de glucosa a distintas concentraciones: 500 µg/mL, 375 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL y 0 µg/mL. Se prepararon tubos por triplicado, a los que se les adicionaron 3 mL de reactivo DNS, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, y la absorbancia se midió mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm (Ver preparación de los reactivos en Anexo 3).

### **3.4. Análisis estadístico**

Los datos de actividad enzimática fueron estadísticamente tratados mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.I (Statistical Graphics Corporation, Rockville, Maryland, Estados Unidos). Inicialmente se llevó a cabo el estudio de la evolución temporal de las distintas actividades enzimáticas para cada uno de los procesos de compostaje de forma independiente. Posteriormente, se analizaron los resultados con el objeto de establecer diferencias y/o semejanzas entre las plantas que compartían materias primas similares. Y, por último, se trató de investigar la presencia de patrones enzimáticos comunes entre procesos de compostaje elaborados a partir de mezclas iniciales muy diferentes.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial a un intervalo de confianza del 95%. Los factores analizados fueron Materia Prima (2 niveles: Lodos, Residuo Vegetal), Muestreo (6 niveles: MPR, MES, TER, ENF, MAD, PRF), y Repetición (3 repeticiones). Además se empleó el Test

de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD) mediante el cual se pudieron identificar aquellos niveles, dentro de cada factor, que fueron significativamente diferentes.

## **4. Resultados y Discusión**

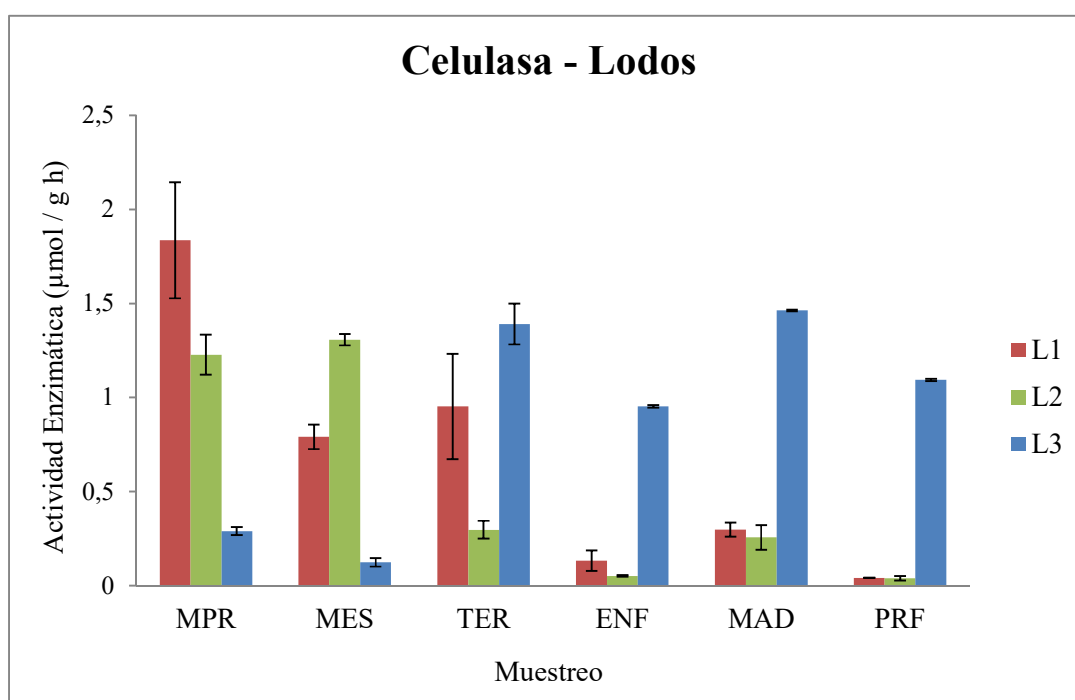
### **4.1. Cuantificación de actividad Celulasa a lo largo del proceso de compostaje**

En la Figura 4.1, se muestra la evolución de la actividad celulasa en las 3 plantas de compostaje destinadas al tratamiento de lodos de depuradora (L1, L2 y L3). En la planta de compostaje L1, se detectó que los niveles mayores de actividad enzimática ocurrieron durante la fase biooxidativa del proceso. En la etapa inicial (MPR), los valores de actividad enzimática fueron de  $1,8356 \mu\text{mol /g h}$  y a medida que el compostaje avanzó hacia la fase termófila (TER), la actividad celulasa fue disminuyendo hasta alcanzar en el producto final (PRF) un valor de  $0,0421 \mu\text{mol /g h}$ .

En la planta de compostaje L2, se observó que las fases del proceso MPR y MES presentaron valores similares de la actividad celulasa ( $1,2282$  y  $1,3068 \mu\text{mol /g h}$ , respectivamente), siendo ésta mayor respecto a los obtenidos en la etapa de maduración. En el producto final la actividad llegó a disminuir hasta valores de  $0,0397 \mu\text{mol /g h}$  (Figura 4.1).

La evolución de la actividad celulasa en la planta L3, fue muy distinta a la de las plantas L1 y L2. En fase MPR, la actividad fue de  $0,2905 \mu\text{mol /g h}$ , incrementándose en la fase termófila (TER) hasta  $1,3906 \mu\text{mol /g h}$  y disminuyendo de nuevo al final del proceso hasta  $1,0929 \mu\text{mol /g h}$  (Figura 4.1).

Los cambios en la actividad celulasa son el resultado directo de la variación de la temperatura durante el proceso de compostaje y de la diversidad microbiana, tanto bacteriana como fúngica, en el interior de las pilas. La notable disminución de la actividad enzimática a lo largo del tiempo, sugiere una reducción de los sustratos disponibles para los microorganismos. Villar *et al.* (2016) en su estudio observaron un ligero aumento de la celulasa en la etapa final del compostaje, lo cual sugirió que la caída de materia orgánica soluble se acompaña de un aumento en la hidrólisis de compuestos orgánicos más complejos.



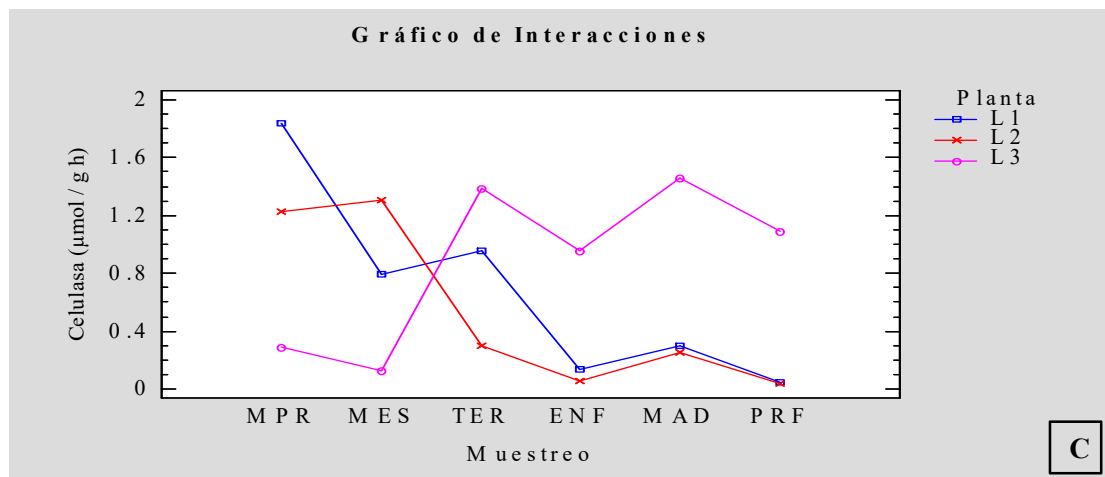
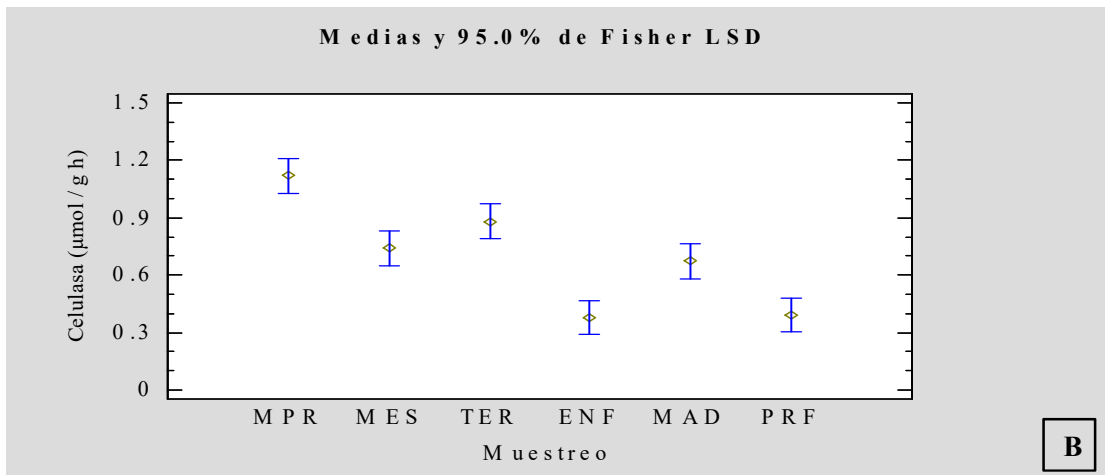
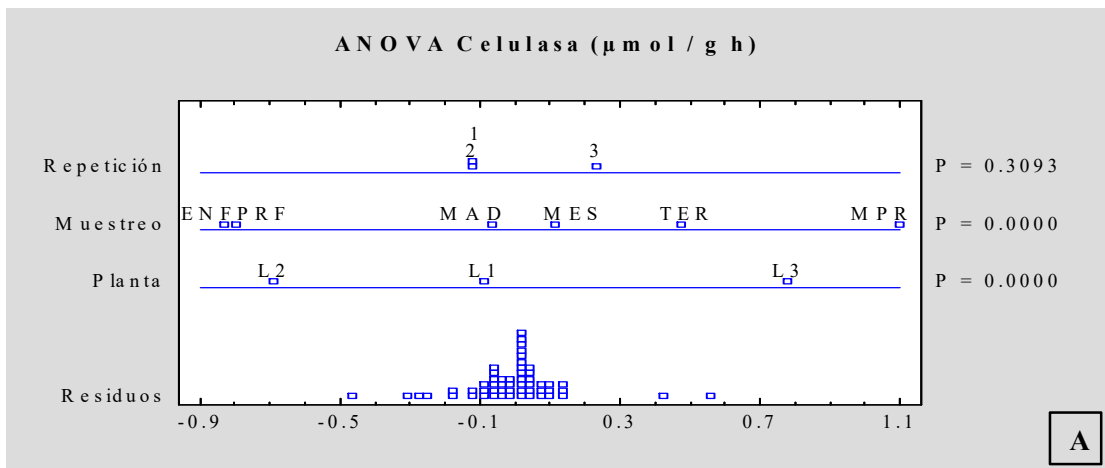
**Figura 4.1.** Actividad enzimática celulasa en plantas de compostaje de lodos.

El análisis ANOVA permitió determinar qué factores influyeron significativamente sobre la actividad celulasa. En este sentido, tanto la fase de muestreo como el tipo de planta de compostaje analizada, repercutieron significativamente en la actividad enzimática (Figura 4.2 A).

En el análisis de múltiple comparación (test LSD), se determinó que la fase MPR del proceso de compostaje de lodos, fue significativamente diferente del resto, obteniéndose los valores más elevados de actividad celulasa (Figura 4.2 B).

Autores como Shuyan *et al.* (2017), concuerdan con lo mencionado anteriormente, y defienden que la tendencia cambiante de la actividad celulasa se produce por la variación de factores como la temperatura, las materias primas y las comunidades bacterianas celulolíticas presentes en el material original.

En la Figura 4.2 C, se presenta el gráfico de interacciones entre los factores Muestreo y Planta (Materia prima original). Se observan en dicha figura diferencias significativas muy marcadas entre las distintas plantas de lodos a lo largo del proceso de compostaje. Las plantas L1 y L2 mostraron una evolución de la actividad celulasa muy similar, de modo que al inicio del proceso la actividad fue alta y en la fase final disminuyó considerablemente. Esta disminución podría indicar una estabilización de las enzimas hidrolíticas y por tanto, de la materia orgánica durante la fase de maduración del compost (Villa *et al.*, 2016). Por el contrario, la planta L3 presentó una variación de la actividad celulasa muy distinta a la observada en las plantas L1 y L2, observándose un incremento anómalo de dicha actividad conforme iba avanzando el proceso de compostaje (Figura 4.2 C).



**Figura 4.2.** Análisis estadístico de la actividad celulasa en plantas de compostaje de lodos. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un 95.0 % de nivel de confianza. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje con respecto a las plantas de lodos analizadas para actividad celulasa.

Con respecto al análisis de actividad celulasa en las plantas de compostaje de residuos vegetales, en RV1 los niveles mayores de actividad enzimática se detectaron en fase mesófila (MES), con un valor de 3,8666  $\mu\text{mol/g h}$ . A medida que el compostaje fue avanzando hacia la fase de maduración (MAD), se obtuvo una actividad de 2,7627  $\mu\text{mol/g h}$ , disminuyendo considerablemente en la fase final hasta un valor mínimo de 0,2481  $\mu\text{mol/g h}$  (Figura 4.3).

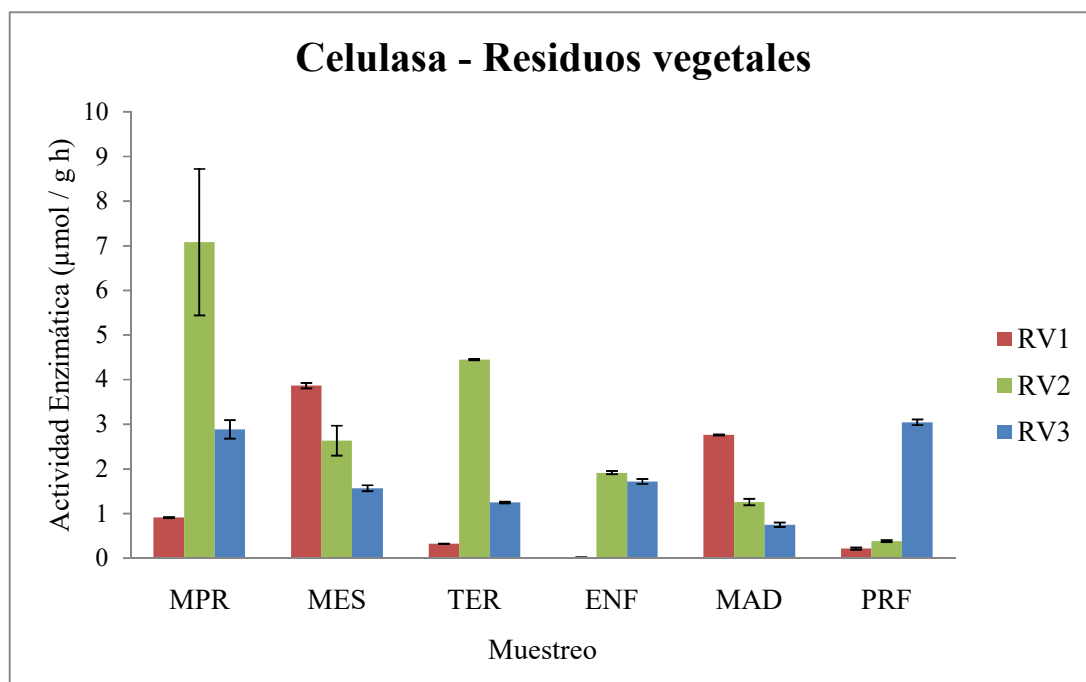
En RV2 al inicio del proceso de compostaje (MPR), se obtuvo una actividad celulasa de 7,0832  $\mu\text{mol/g h}$ , la cual fue disminuyendo notablemente hasta alcanzar valores de 0,3849  $\mu\text{mol/g h}$  al final del proceso (Figura 4.3).

La evolución de la actividad celulasa en la planta RV3, fue muy distinta a las dos anteriores, de modo que en MPR la celulasa alcanzó valores de 2,8855  $\mu\text{mol/g h}$ , y a medida que el proceso iba avanzando la actividad celulasa fue aumentando en términos globales, hasta tomar valores en torno a 3  $\mu\text{mol/g h}$  (Figura 4.3.).

La actividad celulasa depende de la presencia de microorganismos celulolíticos en las materias primas que son el punto de partida de un proceso de compostaje. Una elevada actividad celulolítica probablemente esté relacionada con el suministro inicial de compuestos orgánicos fácilmente degradables. De hecho, la adición de sustancias fácilmente metabolizables ha demostrado acelerar la descomposición de la celulosa. Se cree que, mediante la utilización inicial de los nutrientes carbonatados de fácil degradación, la población microbiana celulolítica puede ver favorecido su desarrollo. Una vez que la fuente de carbono más fácilmente degradable se convierte en limitante, los microorganismos se adaptan a la celulosa, activándose globalmente la hidrólisis de la misma. Por lo tanto, lo más lógico sería que la máxima degradación de la celulosa durante el proceso de compostaje de restos vegetales, tuviera lugar



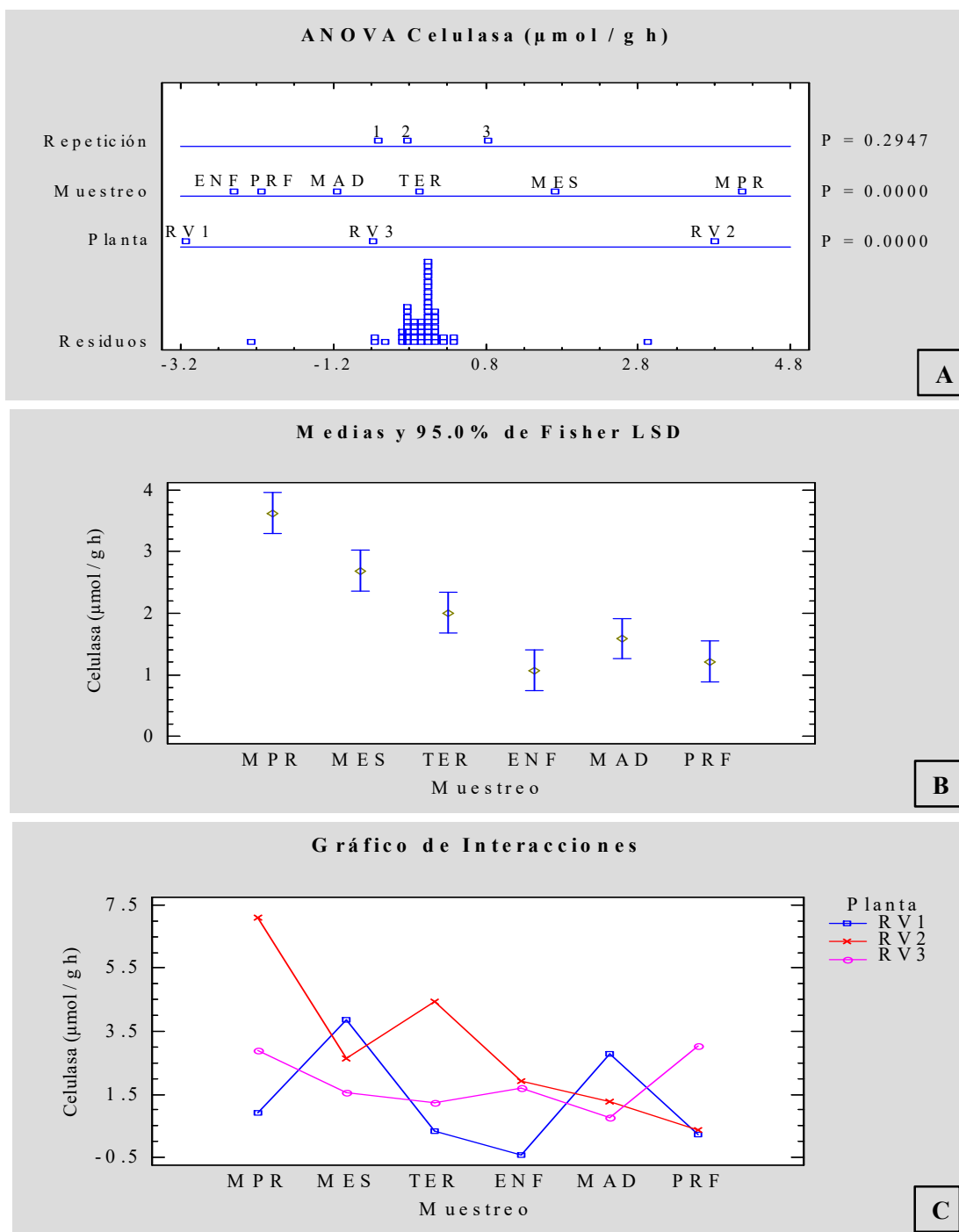
durante las etapas iniciales del proceso, de modo que fuera descendiendo conforme éste fuera avanzando hacia las fases de maduración y producto final (Cunha-Queda *et al.*, 2007).



**Figura 4.3.** Actividad enzimática celulasa en plantas de compostaje de residuos vegetales.

Los resultados derivados del análisis estadístico realizado en este caso mostraron una clara influencia de los factores muestreo y materias primas de partida (Figura 4.4 A).

El test de múltiple comparación, reveló diferencias significativas entre las fases MPR, MES y TER del proceso, mientras que las fases ENF, MAD y PRF, mostraron un comportamiento similar entre ellas, desde un punto de vista estadístico (Figura 4.4 B).



**Figura 4.4.** Análisis estadístico de la actividad celulasa en plantas de compostaje de restos vegetales. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un 95.0 % de nivel de confianza. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje con respecto a las plantas de restos vegetales analizadas para actividad celulasa.

En el gráfico de interacción entre los factores muestreo y planta de compostaje (Figura 4.4 C), se observó que las plantas RV2 y RV3, presentaron una actividad celulasa mayor al inicio del proceso, con respecto a lo detectado en la planta RV1. Al final del proceso, RV1 y RV2 mostraron un descenso importante de la actividad celulasa respecto a la fase inicial, mientras que en RV3 la actividad celulasa aumentó hasta un valor aproximadamente igual al observado inicialmente en los materiales de partida.

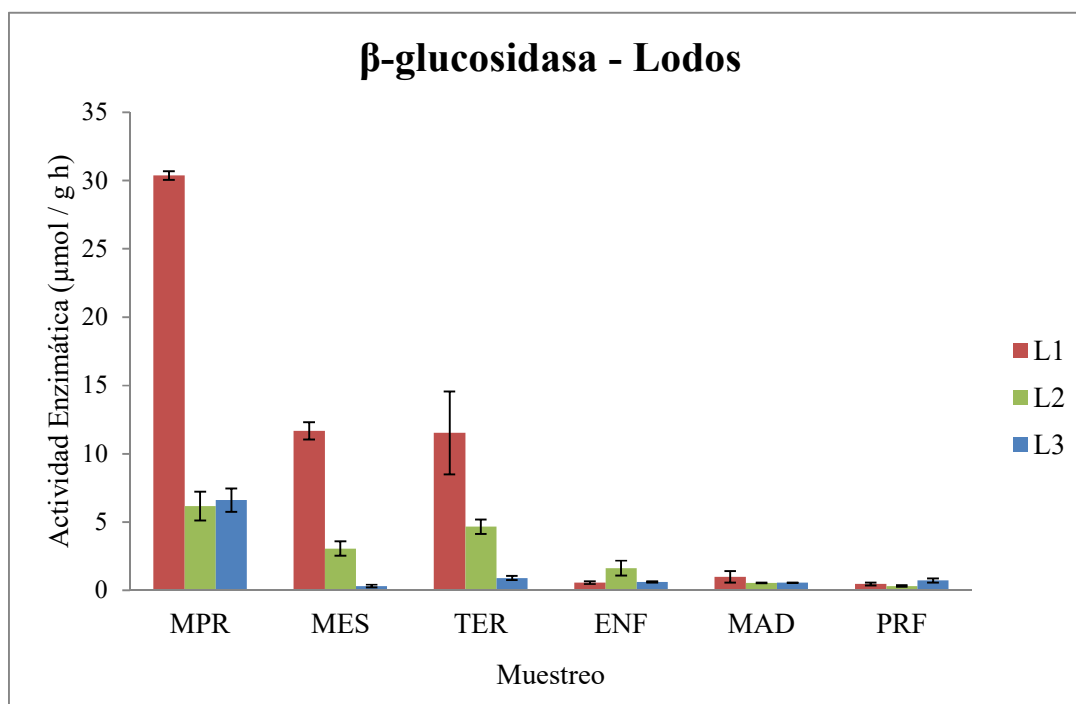
En términos generales, los resultados de Nonglak *et al.* (2009), son comparables con los encontrados en este estudio, habiendo observado un rápido incremento en la actividad celulasa durante las primeras fases del proceso de compostaje, seguida de una brusca disminución de la enzima, que continuó siendo más suave hacia las fases finales del proceso.

#### **4.2. Cuantificación de actividad $\beta$ -glucosidasa a lo largo del proceso de compostaje**

En el análisis de la actividad  $\beta$ -glucosidasa se obtuvo como resultado que la mayor actividad enzimática se encontró en la fase biooxidativa del proceso para las plantas L1, L2 y L3. En MPR se encontraron actividades enzimáticas de 30,366; 6,1615 y 6,6113  $\mu\text{mol/g h}$ , respectivamente. Al final del proceso la  $\beta$ -glucosidasa disminuyó considerablemente hasta llegar a valores de 0,4590; 0,3046 y 0,7226  $\mu\text{mol/g h}$  en el producto final (Figura 4.5).

De forma global, los valores de actividad  $\beta$ -glucosidasa disminuyeron de forma gradual desde el inicio hasta la fase de maduración del proceso en los tres procesos de compostaje de lodos. Esta enzima está estrechamente involucrada con el ciclo del carbono y juega un papel importante en los procesos hidrolíticos que tienen lugar durante la descomposición de la materia orgánica. Wong y Fang (2000), encontraron altos niveles de  $\beta$ -glucosidasa en procesos de compostaje que tenían como materia prima principalmente lodos de depuradora, lo cual

concuerta con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, principalmente aquellos derivados de la planta L1.



**Figura 4.5.** Actividad enzimática β-glucosidasa en plantas de compostaje de lodos.

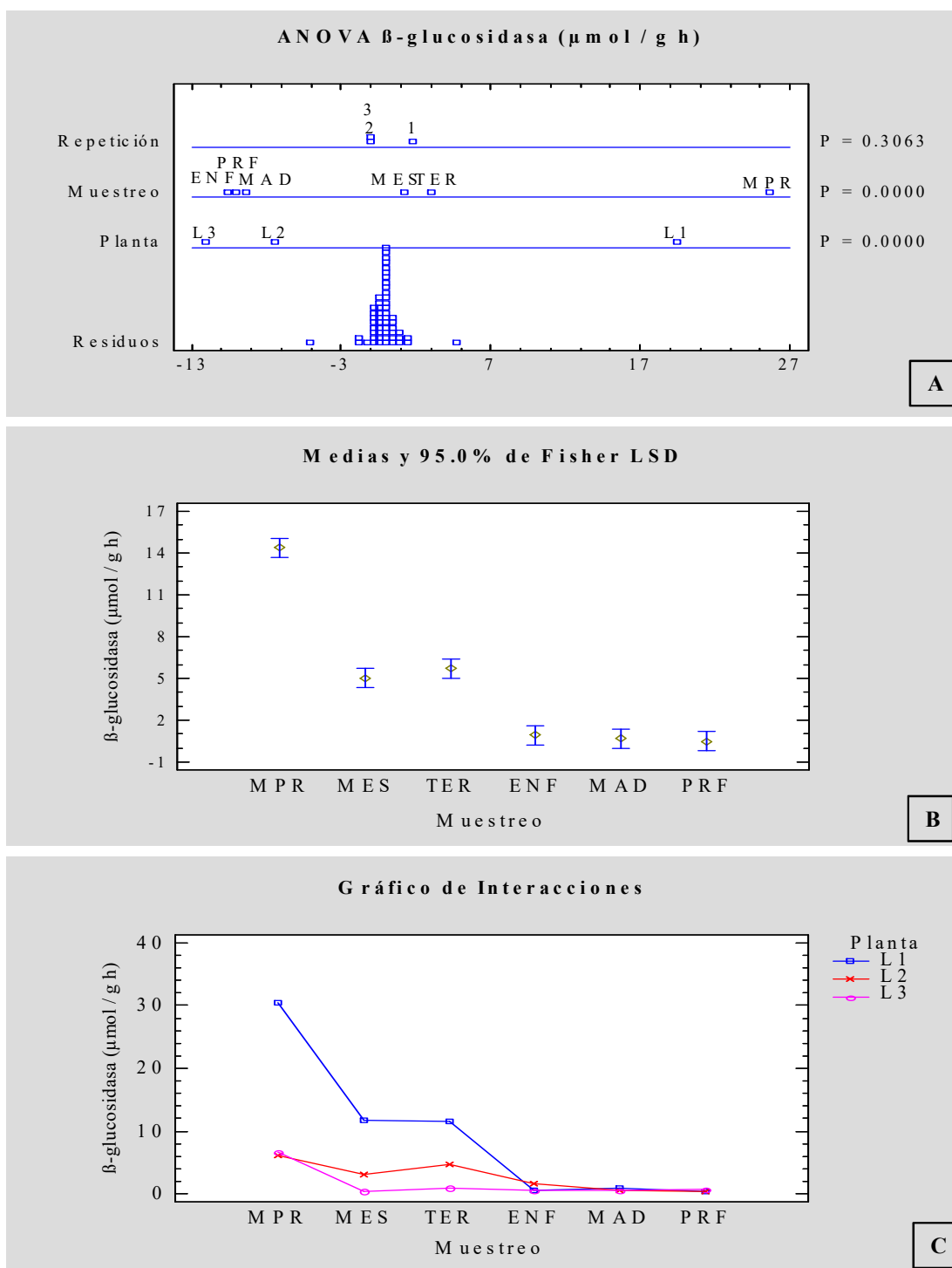
En el estudio realizado por Villar *et al.* (2016), con pilas de compost elaboradas a partir de lodos de depuradora, se observaron valores muy elevados de actividad β-glucosidasa. Se cree que la baja relación C/N mostrada por este tipo de materiales, podría requerir un aumento de la síntesis de la enzima. Por tanto, la síntesis de β-glucosidasa podría verse activada a causa de una limitación de carbono con respecto al nitrógeno y fósforo disponibles, siendo éste un fuerte incentivo para que los microorganismos busquen nuevas fuentes de carbono (Villar *et al.*, 2016).

Los resultados del análisis ANOVA para la β-glucosidasa, revelaron la influencia significativa de los factores muestreo y materias primas en la actividad enzimática (Figura 4.6 A).

El test de múltiple comparación, mostró diferencias estadísticamente significativas entre MPR y las fases MES y TER correspondientes a la etapa biooxidativa del proceso. Durante la etapa final, las fases de enfriamiento, maduración y producto final no fueron diferentes estadísticamente (Figura 4.6 B).

En términos generales, las 3 plantas de compostaje de lodos presentaron un comportamiento similar en relación con la actividad  $\beta$ -glucosidasa, principalmente las plantas L2 y L3 (Figura 4.6 C). En la fase biooxidativa dicha actividad fue notablemente superior respecto a la fase de maduración, sólo en el caso de la planta L1.

Resultados similares a los obtenidos en este estudio han sido reportados por Vargas *et al.* (2010), en los que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa fue máxima en las primeras etapas de un proceso de compostaje de lodos de depuradora, y mínima, entre las etapas de maduración y producto final.

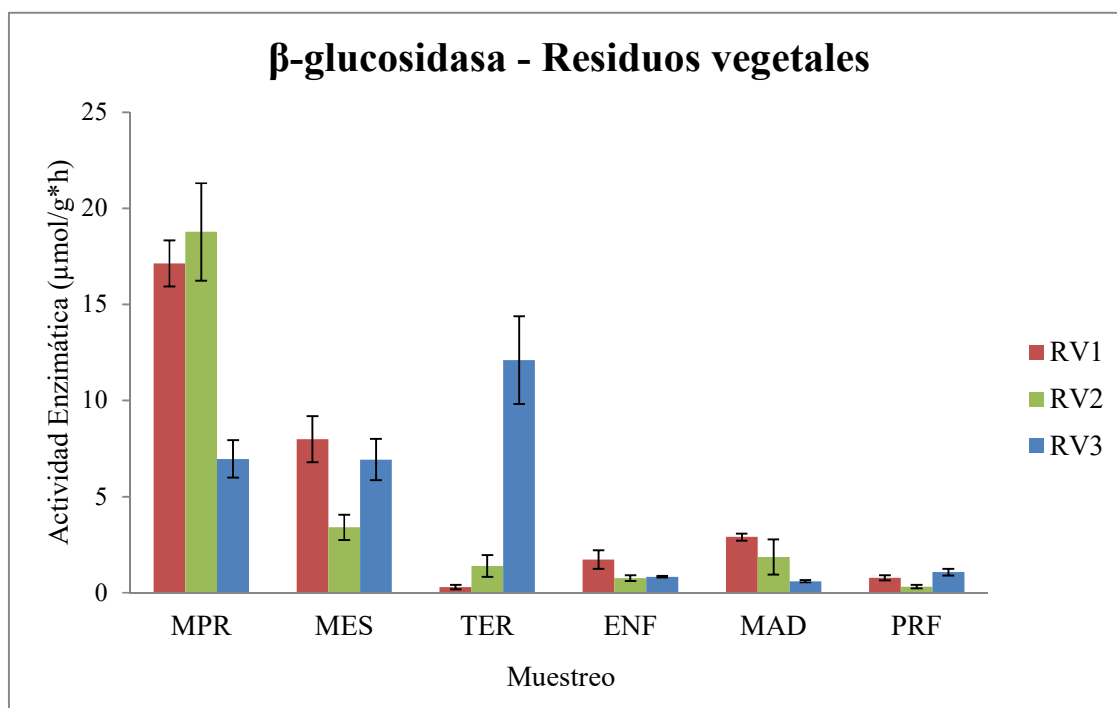


**Figura 4.6.** Análisis estadístico de actividad  $\beta$ -glucosidasa en plantas de compostaje de lodos. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un nivel confianza del 95.0 %. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje y las distintas plantas analizadas para actividad  $\beta$ -glucosidasa.

En las plantas de compostaje de residuos vegetales, la actividad  $\beta$ -glucosidasa en las plantas RV1 y RV2 mostró los mayores valores de actividad enzimática durante la fase biooxidativa del proceso. En MPR se detectó una actividad de 17,1473 y 18,7742  $\mu\text{mol/g h}$ , respectivamente, disminuyendo al final del proceso hasta alcanzar valores de 0,7778 y 0,3129  $\mu\text{mol/g h}$  (Figura 4.7).

La planta de compostaje RV3, presentó una actividad  $\beta$ -glucosidasa distinta a las dos anteriores, ya que en MPR se detectó una actividad de 6,9636  $\mu\text{mol/g h}$ , bastante menor a la observada en las plantas RV1 y RV2. Durante la fase termófila (TER) la actividad se incrementó hasta llegar a valores de 12,0991  $\mu\text{mol/g h}$ , para volver de nuevo a disminuir gradualmente hasta valores de 1,0706  $\mu\text{mol/g h}$  en el producto final (Figura 4.7).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los encontrados por Cunha-Queda *et al.* (2007). Dichos autores detectaron los valores máximos de actividad  $\beta$ -glucosidasa durante la etapa inicial del proceso, los cuales fueron descendiendo hasta valores mínimos durante la fase de maduración. La baja actividad  $\beta$ -glucosidasa en las etapas finales del compostaje se justifica como consecuencia de la disminución de los sustratos orgánicos disponibles.



**Figura 4.7.** Actividad enzimática β-glucosidasa en plantas de compostaje de residuos vegetales.

El análisis estadístico de los resultados permitió determinar que el factor muestreo influyó significativamente en la evolución de la actividad β-glucosidasa a lo largo de los 3 procesos de compostaje de restos vegetales analizados (Figura 4.8 A).

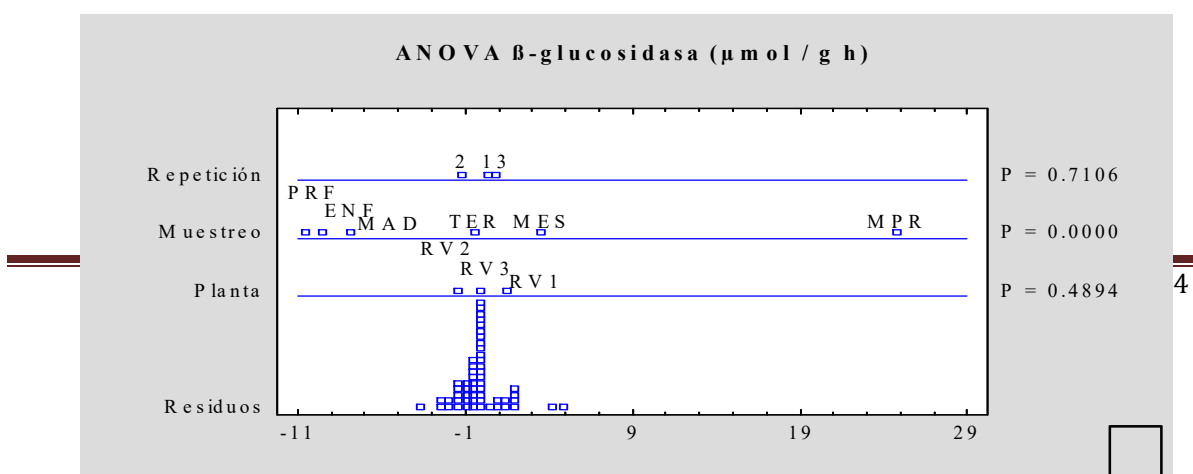
El test de múltiple comparación, reveló 3 grupos de homogeneidad claramente diferenciados. Por un lado las materias primas (MPR), con los valores más elevados de actividad; por otro los muestreos MES y TER, correspondientes a la etapa biooxidativa del compostaje; y finalmente los muestreos ENF, MAD y PRF, con los niveles más bajos de actividad (Figura 4.8 B).

Durante la fase biooxidativa del proceso de compostaje, las plantas RV1 y RV2 en MPR presentaron una actividad β-glucosidasa mayor respecto a lo observado en RV3. Por otro lado, en la fase de maduración las tres plantas se comportaron de manera similar, mostrando una actividad enzimática muy baja al final del proceso (Figura 4.8 C).



La  $\beta$ -glucosidasa es responsable de la hidrólisis de varios  $\beta$ -glucósidos, principalmente celobiosa, dando lugar a glucosa como producto final. Los niveles de esta actividad se determinan por la presencia de sustratos fácilmente metabolizables. Por tanto, aquellas fases del compostaje caracterizadas por una mayor disponibilidad de tales compuestos, están asociadas a altas actividades de la  $\beta$ -glucosidasa. En consecuencia, los niveles máximos de la enzima se encontraran en las etapas iniciales del compostaje, y disminuirán durante la etapa de maduración (López *et al.*, 2014).

La variación de la concentración de enzima se verá influenciada por la presencia de compuestos carbonatados derivados de las actividades celulolíticas y hemicelulolíticas de los microorganismos presentes en el compost, las cuales se encuentran activos principalmente durante el final de la etapa termófila y la fase de enfriamiento que precede a la maduración (López *et al.*, 2014).



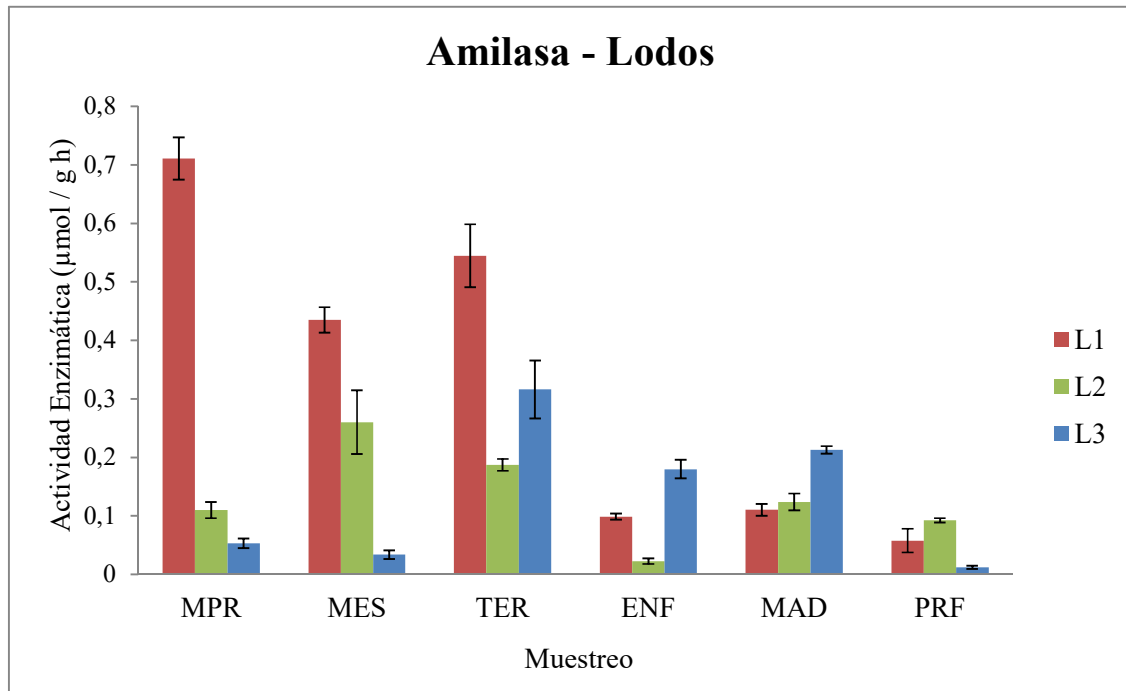
**Figura 4.8.** Análisis estadístico de actividad  $\beta$ -glucosidasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de múltiple comparación a un nivel del 95.0 % de confianza. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje y las plantas analizadas para actividad  $\beta$ -glucosidasa.

#### **4.3. Cuantificación de actividad Amilasa a lo largo del proceso de compostaje**

La evolución de la actividad amilasa resultó ser muy variable en función de la planta de lodos muestreada. Durante la fase biooxidativa del proceso, concretamente en MPR se detectó una actividad amilasa en torno a 0,7107; 0,1099 y 0,0529  $\mu\text{mol/g h}$ , en las plantas L1, L2 y L3,

respectivamente. A medida que el compostaje fue avanzando hacia la fase termófila, se observó un incremento de la actividad amilasa en las plantas L2 y L3, mientras que, en L1 la actividad disminuyó globalmente respecto a lo encontrado en la fase inicial. Al final del proceso, en las tres plantas de lodos (L1, L2 y L3) la actividad amilasa se vio disminuida hasta valores de 0,0574; 0,0923 y 0,0118  $\mu\text{mol/g h}$  (Figura 4.9).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los descritos por De Melo *et al.* (2002). Estos autores detectaron valores elevados de actividad amilasa durante el compostaje de lodos de depuradora, lo cual puede sugerir que el tipo de materias primas utilizadas en ese caso presentaban componentes inductores de actividad amilasa. Dicha actividad, según los mismos autores, disminuyó notablemente en función del tiempo, llegando incluso a ser nula después de 3-4 meses desde el inicio del proceso.

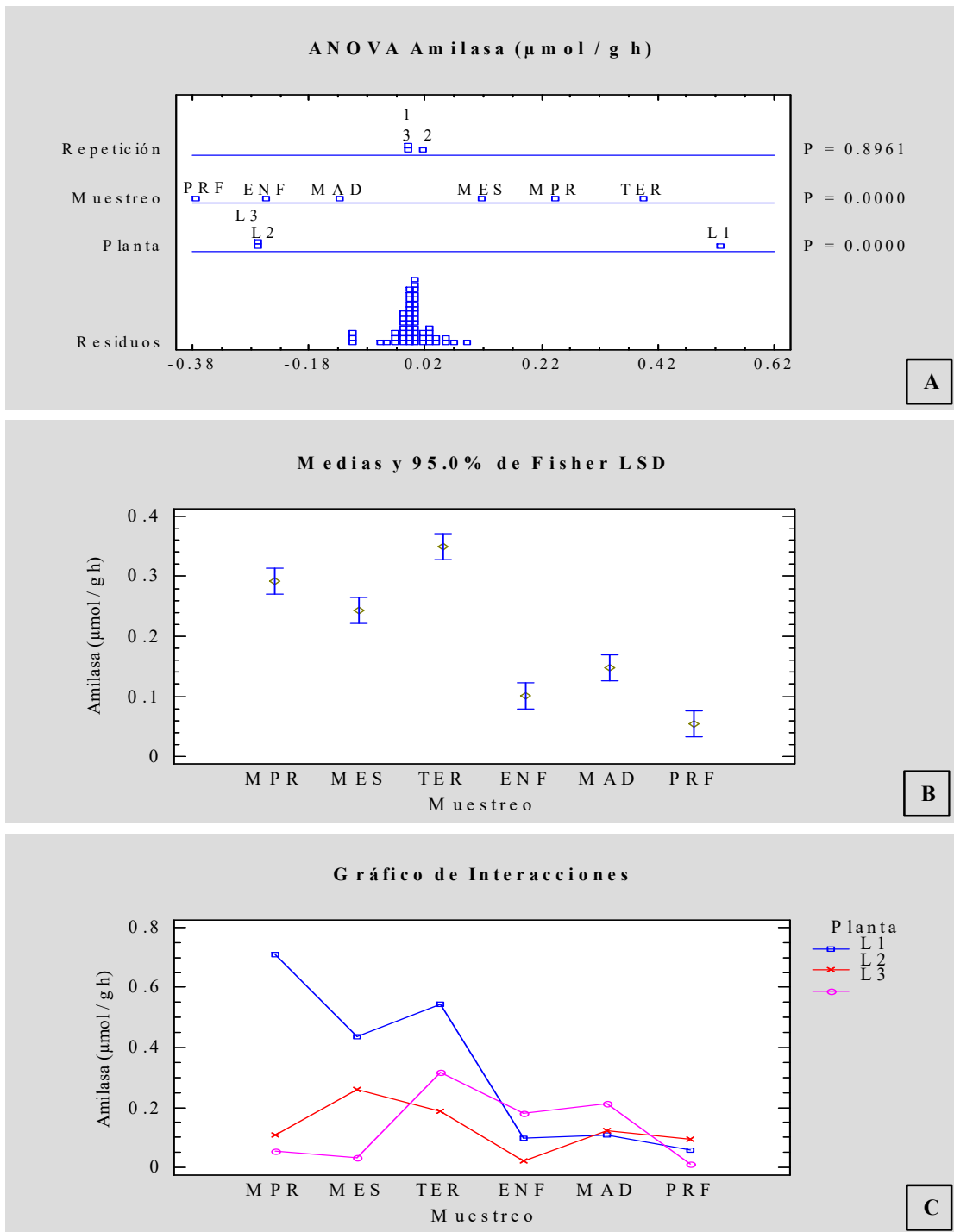


**Figura 4.9.** Actividad enzimática amilasa en plantas de compostaje de lodos.

El análisis estadístico realizado para la actividad amilasa durante el compostaje de lodos de depuradora, reveló que tanto el factor muestreo como planta influyeron significativamente sobre los valores de dicha actividad enzimática (Figura 4.10 A).

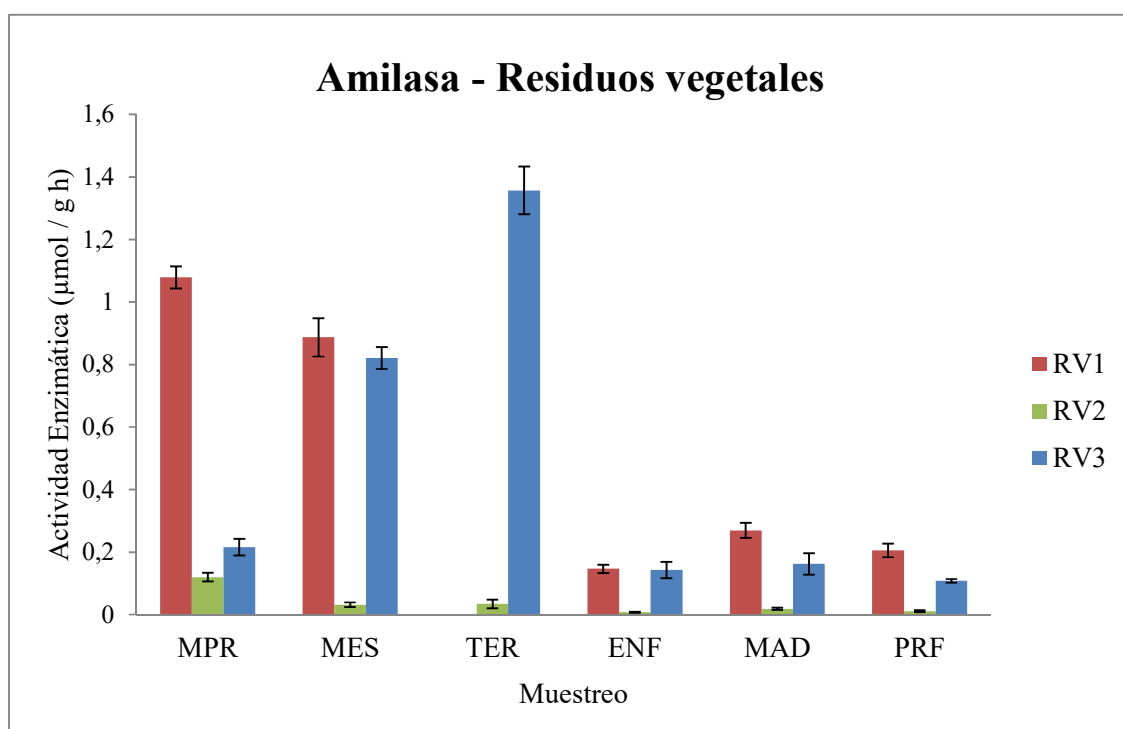
Tras realizar un test de comparación múltiple, se encontró que todas las fases del proceso de compostaje presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (Figura 4.10 B), aunque los datos pudieron agruparse claramente en dos grupos de homogeneidad diferentes, uno para los muestreos correspondientes a la fase biooxidativa y otro para aquellos que correspondieron a la fase de maduración.

Las plantas L2 y L3 presentaron en MPR una actividad amilasa menor con respecto a lo observado en la fase biooxidativa del proceso L1. Durante las etapas de maduración, las tres plantas mostraron un comportamiento similar entre ellas (Figura 4.10 C).



**Figura 4.10.** Análisis estadístico de actividad amilasa en plantas de compostaje de lodos. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, test de comparación múltiple a un 95.0 % de nivel de confianza. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases de compostaje y las plantas analizadas para actividad amilasa.

La evolución de la amilasa en las 3 plantas de compostaje de residuos vegetales muestreadas, RV1, RV2 y RV3, fue muy diferente. Los valores de actividad amilasa en MPR fueron de 1,0783; 0,1202 y 0,2158  $\mu\text{mol/g h}$ , respectivamente, sin embargo sólo en el caso del proceso RV3 se observó un incremento global de la actividad amilasa durante la fase termófila. Con respecto a las etapas finales de maduración la actividad amilasa disminuyó globalmente a lo observado en las materias primas, para alcanzar valores al final del proceso de 0,2053; 0,0113 y 0,1079  $\mu\text{mol/g h}$ , respectivamente en RV1, RV2 y RV3 (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Actividad enzimática amilasa en plantas de compostaje de residuos vegetales.

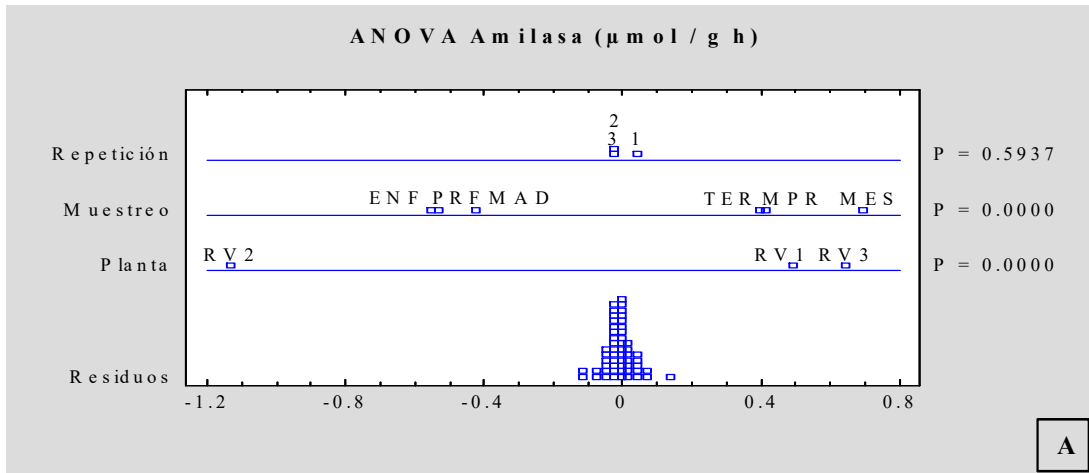
El análisis estadístico realizado a partir de los datos de actividad amilasa, reveló que tanto el factor muestreo como planta influyeron significativamente en la evolución de dicha actividad (Figura 4.12 A).

Al realizar el test de múltiple comparación, se observó que durante la fase mesófila, previa a la etapa de altas temperaturas, se obtuvieron los datos de actividad amilasa mayores y estadísticamente diferentes del resto. Globalmente, los datos de actividad fueron superiores durante la fase biooxidativa, en relación a lo observado en la fase de maduración y producto final.

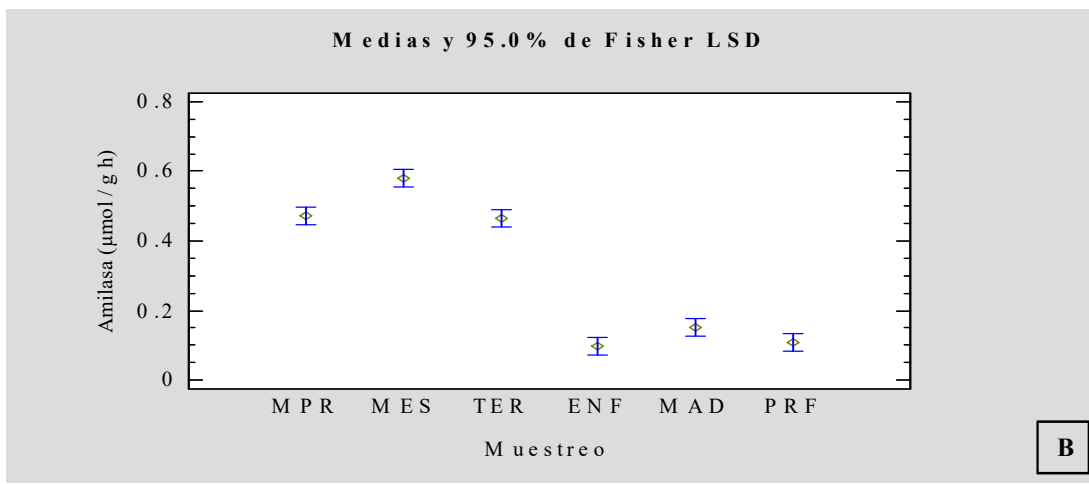
En términos generales, la actividad amilasa disminuyó a lo largo de los procesos analizados en RV1 y RV2, mientras que en RV3 se detectó un aumento significativo durante la fase termófila (TER) (Figura 4.12 B). El efecto mencionado anteriormente, podría estar relacionado con el incremento de la temperatura producido a medida que el compostaje avanza, puesto que la actividad amilasa es directamente proporcional a ésta (Patnaik *et al.*, 2017). Aunque dicho fenómeno no fue tan notable en el caso de las plantas RV1 y RV2.

En la fase inicial de los procesos RV2 y RV3, se observaron valores de actividad amilasa menores que aquellos relacionados con el proceso RV1. Sin embargo, al final del proceso, las tres plantas se comportaron de manera similar (Figura 4.12 C).

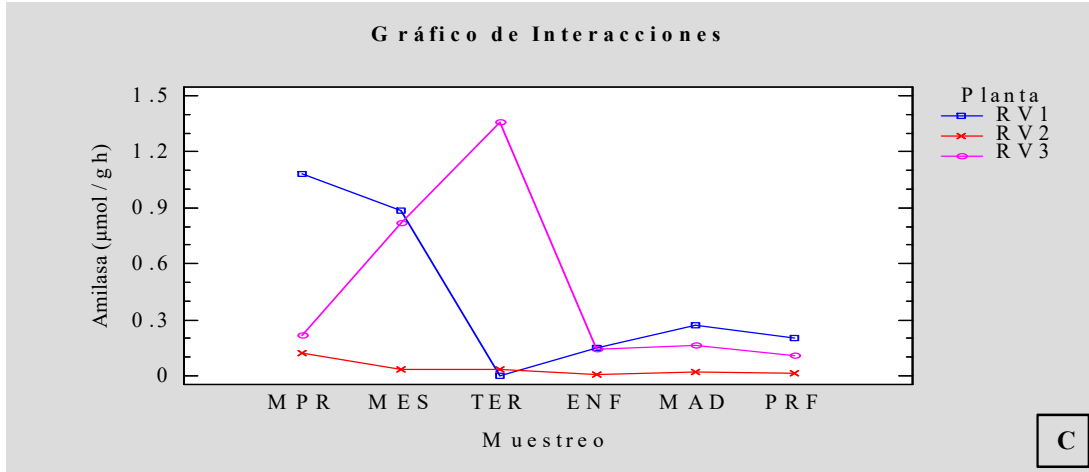
Una posible explicación para estos resultados podría ser la estabilización de las enzimas con respecto al tiempo de compostaje, como lo determinó Singh *et al.* (2016), realizando un estudio de actividad amilasa en el que encontró que la enzima se estabilizaba después de 75 y 90 días de compostaje. Durante los primeros 30 días, dichos autores obtuvieron los mayores valores de actividad amilasa, los cuales fueron disminuyendo conforme fue avanzando el proceso de compostaje.



A



B



C

**Figura 4.12.** Análisis estadístico de actividad amilasa en plantas de compostaje de residuos vegetales. **A.** Gráfico ANOVA a un 95.0 % de nivel de confianza. **B.** Gráfico de medias, y test de comparación múltiple a un nivel confianza del 95.0 %. **C.** Gráfico de interacciones entre las distintas fases del compostaje y las plantas analizadas para actividad amilasa.



El análisis estadístico global realizado para las seis plantas de compostaje, reveló que las actividades  $\beta$ -glucosidasa y amilasa, no se vieron afectadas significativamente por el tipo de materias primas compostadas (Figuras 4.13 C y 4.13 E); mientras que dicho factor sí influyó notablemente en los valores de actividad celulasa observados (Figura 4.13 A).

La mayoría de las modificaciones que experimenta la materia orgánica durante el compostaje están mediadas por enzimas. Así, el monitoreo de las actividades enzimáticas a lo largo del proceso ofrece una valiosa información relacionada con la dinámica de importantes elementos nutricionales como C, N o P, y contribuye a una mejor comprensión de las transformaciones que tienen lugar durante el compostaje (Vargas *et al.*, 2010).

Por otro lado, la materia prima en el compostaje puede llegar a ser un factor determinante de la evolución y calidad del proceso. Si se utiliza como materia prima biosólidos municipales o industriales, como es el caso de los lodos de depuradora, el compostaje se dificulta debido a que éstos llegan a tener contenidos de humedad del 70 al 80%, y la presencia de tal cantidad de agua da como resultado una disminución de las temperaturas típicas de un proceso de compostaje, baja transferencia de oxígeno, y tendencia a la compactación de los materiales. En este caso, la adición de un material esponjante como las astillas de madera, aserrín o material vegetal previenen la compactación del material, incrementando la porosidad y transferencia de oxígeno al sustrato, ayudando al crecimiento de microorganismos y consecuentemente, el aumento de la actividad enzimática (Silva *et al.*, 2004).

En el caso de los sustratos de origen vegetal, pueden requerir separación y adición de nutrientes, particularmente nitrógeno, reducción de tamaño y adición de agua a la mezcla, para evitar limitaciones microbiológicas por escasez de humedad. En este caso se debe utilizar un agente

esponjante absorbente, que mantenga un alto grado de humedad en el material favoreciendo la actividad microbiológica y el aumento de la actividad enzimática (Silva *et al.*, 2004).

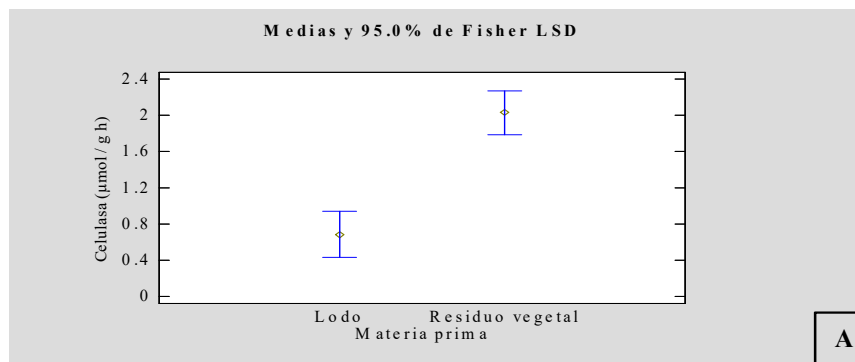
En general, en el caso de las tres enzimas analizadas, se observó una evolución similar de la actividad enzimática tanto para lodos como para residuos vegetales, de modo que al inicio del proceso la actividad biológica fue más elevada que en la fase final. Sin embargo, en el caso de la amilasa se observaron importantes fluctuaciones de la actividad en función del tiempo de muestreo. En el caso de la fase termófila (TER) del compostaje de lodos, la actividad fue mayor que en el caso de residuos vegetales.

Por otro lado, en el caso de los procesos RV, durante la fase MES la actividad fue mayor con respecto a lo observado en las fases iniciales. No obstante, dicha actividad se estabilizó y se comportó de manera muy similar durante las fases finales del proceso, y en ambos tipos de materias primas (Figuras 4.13 B y 4.13 F).

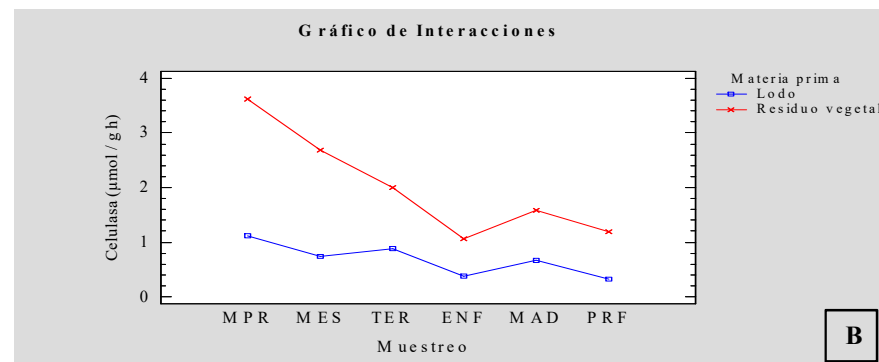
De forma global, se detectó que la actividad  $\beta$ -glucosidasa en lodos y en residuos vegetales fue idéntica desde un punto de vista estadístico, respecto a los materiales como a las distintas etapas del proceso (Figuras 4.13 C y D). Al inicio, dicha actividad fue elevada, disminuyendo gradualmente conforme fue avanzando el proceso. Esta enzima aporta información acerca de la estabilidad de la materia orgánica constituyente del compost, así como de los sustratos carbonatados susceptibles a la biodegradación; además, es útil como referencia cualitativa del estado de descomposición en el que se encuentra el material compostado (Acosta *et al.*, 2012).

En resumen, los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad enzimática en muestras de compostaje, indican que las enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos se correlacionan fuertemente entre ellas, y que el proceso de descomposición de los residuos

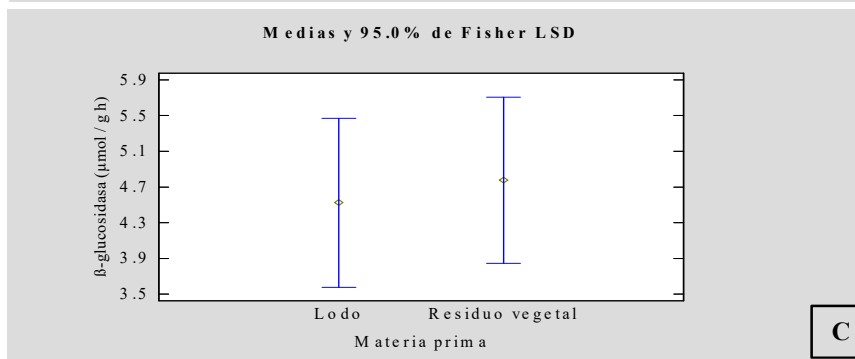
produce cambios significativos en las actividades de las distintas enzimas, sugiriendo a su vez cambios en el crecimiento de los microorganismos (Acosta *et al.*, 2012). Por otro lado, queda claro que los factores operacionales son únicos para cada proceso, aunque existen tendencias generales respecto a las actividades enzimáticas analizadas. De hecho, los datos derivados de este trabajo confirman la estrecha relación entre las distintas etapas del proceso y la actividad enzimática, así como entre éstas y las distintas materias primas analizadas. Sólo en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa se ha revelado una clara tendencia común a todos los procesos de compostaje muestreados, lo que la convierte en un bioindicador idóneo para estudiar la evolución de un proceso de compostaje en términos de calidad, e independientemente de las materias primas de partida.



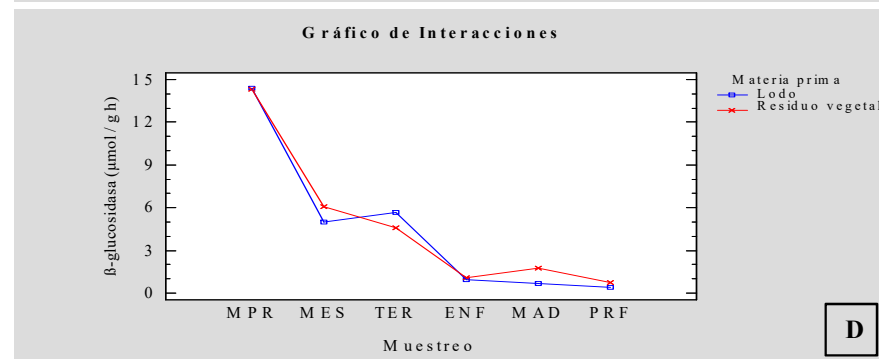
**A**



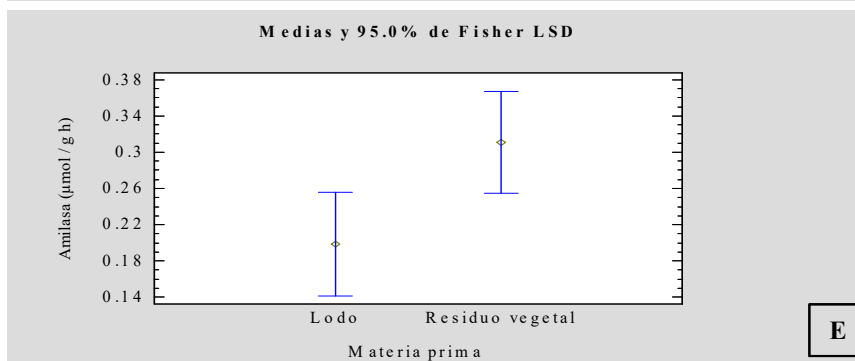
**B**



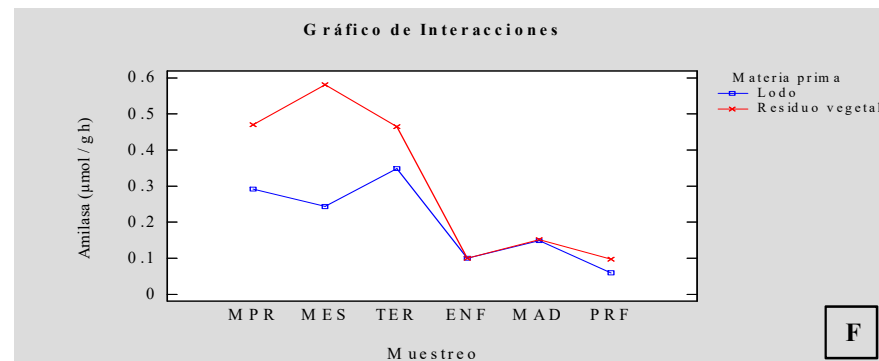
**C**



**D**



**E**



**F**

**Figura 4.13.** Análisis estadístico comparativo de actividad enzimática en plantas de compostaje de lodos y residuos vegetales. **A, C & E.** Gráficos de medias para celulasa, β-glucosidasa y amilasa respectivamente, y test de comparación múltiple a un nivel de confianza del 95.0 %. **B, D & F.** Gráficos de interacciones entre muestreo y materia prima empleada en cada planta de compostaje analizada, para actividad enzimática celulasa, β-glucosidasa y amilasa respectivamente.

## **5. Conclusiones**

- En términos generales, las actividades enzimáticas celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa, mostraron valores elevados de actividad durante la fase biooxidativa del proceso de compostaje, para luego disminuir paulatinamente conforme se avanzó en el proceso de humificación de los materiales.
- Los resultados derivados de este trabajo confirmaron la estrecha relación entre las distintas etapas del proceso de compostaje y los valores de actividad enzimática detectados, así como entre éstos y el tipo de materias primas utilizadas en cada planta.
- De forma global, los datos de actividad enzimática resultaron ser más homogéneos en el caso de las plantas de compostaje que utilizaron restos vegetales como materias primas de partida.
- La actividad  $\beta$ -glucosidasa, al comportarse de forma similar en ambos tipos de procesos (lodos y restos vegetales), podría ser utilizada como un indicador biológico idóneo para monitorizar la evolución del proceso de compostaje en términos de calidad.
- De acuerdo con los resultados, la naturaleza de la materia prima y la temperatura fueron factores determinantes en las actividades enzimáticas y en la evolución del proceso de compostaje.

## **6. Bibliografía**

- Acosta, Y., El Zauahre, M., Rodríguez, L., Reyes, N., & Rojas, D. (2012). Indicadores de calidad bioquímica y estabilidad de la materia orgánica durante el proceso de compostaje de residuos orgánicos. *Multiciencias*, 390-399.
- Álvarez, J. (2003). Manual de compostaje para agricultura ecológica. Andalucía, España: Albanta creativos, S.I.
- Cooperband, L. (2000). Composting: Art and science of organic waste conversion to a valuable soil resource . *Ce Update - Waste III* , 283 - 288.
- Cunha-Queda, A., Ribeiro, H., Ramos, A., & Cabral, F. (2007). Study of biochemical and microbiological parameters during composting of pine and eucalyptus bark. *Bioresource technology*, 3213-3220.
- De Melo, W., Marques, M., Ferreira, M., Peruca De Melo, G., & Peruca De Melo, V. (2002). Chemical properties and enzyme activity in a sewage sludge treated soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1646-1659.
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soil. . *Soil Biology and Biochemistry* 20, 601-606.
- Ferraz, R., Rezende, E., & Pinheiro, R. (2015). Soil quality: Enzymatic activity of soil  $\beta$ -glucosidase. *Global Journal of Agricultural Research and Reviews*, 146-150.
- García Izquierdo, C., Gil, F., Hernández, T., & Trasar, C. (2003). *Técnicas de Análisis de parámetros bioquímicos de suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid: Mundi Prensa.

- Guisado Ubeda, G. (2008). Aislamiento y selección de microorganismos de interés industrial y/o ambiental a partir de materiales sometidos a compostaje. Tesis Doctoral, Universidad de Almería.
- Hansgate, A., Schloss, P., Hay, A., & Walker, L. (2005). Molecular characterization of fungal community dynamics in. *FEMS Microbiology Ecology*, 209-214.
- Haug, R. (1993). *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Florida: Lewis Publishers.
- Ksobucki , P., Chmarzynski, A., & Buszewski, B. (2000). Sewage Sludge Composting . *Polish Journal of Environmental Studies*, 243 - 248.
- Kulcu, R., & Yaldiz, O. (2004). Determination of aeration rate and kinetics of composting. *Bioresource Technology*, 49-57.
- Liang, C., Das, K., & McClendon, R. (2003). The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology* , 131 - 137.
- Libmond, S., & Savoie, J. M. (1993). Degradation of wheat straw by a microbial community - stimulation by a polysaccharidase complex. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 40: 567-574.
- López, J. A., Vargas, M. d., López, M. J., Suárez, F., Jurado, M., & Moreno, J. (2014). Enzymatic characterization of microbial isolates from lignocellulose waste composting: chronological evolution. *Journal of Environmental Management*, 137-146.

- López, J., Suárez, F., Vargas, M., López, M., Jurado, M., & Moreno, J. (2015). Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste. *Bioresource Technology*, 406-416.
- Mishra, P. C., Mohanty, R. K., & Dash, M. C. (1979). Enzyme activity in subtropical surface soils under pasture. *Indian Journal of Chemistry*, 12, 19-24.
- Mondini, C., Fornasier, F., & Sinicco, T. (2004). Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1587-1594.
- Moreno, J., & Moral, R. (2008). *Compostaje*. Madrid: Mundi - Prensa.
- Nonglak, S., Srisulak, D., Panalak, S., Somsak, J., Sukanya, B., Janewit, W., & Chaiwat, J. (2009). Composting of tobacco plant waste by manual turning and forced aeration system. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 248-260.
- Pascon, R., Bergamo, R., Spinelli, R., Dutra de Souza, E., Assis, D., Juliano, L., & Vallim, M. (2011). Amylolytic Microorganism from São Paulo Zoo Composting: Isolation, Identification, and Amylase Production. *Enzyme research*, 1-9.
- Pati, S. S., & Sahu, S. K. (2003). CO<sub>2</sub> evolution and enzyme activities (dehydrogenase, protease and amylase) of fly ash amended soil in the presence and absence of earthworms (*Drawida willsi* Michaelsen). *Geoderma*, 118, 289-301.
- Patnaik, A., & Naik, L. (2017). Investigation of enzyme activities during composting of soiled cotton waste. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 1-9.



- Piotrowska-Cyplik, A., Olejnik, A., Cyplik, P., Dach, J., & Czarnecki, Z. (2009). The kinetics of nicotine degradation, enzyme activities and genotoxic potential in the characterization of tobacco waste composting. *Bioresource Technology*, 5037-5044.
- Raut, M., William, S., Bhattacharyya, J., Chakrabarti, T., & Devotta, S. (2008). Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste - A compost maturity analysis perspective. *Bioresource Technology*, 6512-6519.
- Sánchez-Monedero, M., Roig, A., Paredes, C., & Bernal, M. (2001). Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology*, 301-308.
- Shuyan, L., Jijin, L., Jing, Y., Guoxue, L., Bing, Z., & Yangyang, L. (2017). The influences of inoculants from municipal sludge and solid waste on compost stability, maturity and enzyme activities during chicken manure composting. *Environmental Technology*, 1-9.
- Silva, J. P., López, P., & Valencia, P. (2004). Recuperación de nutrientes en fase sólida a través del compostaje. Cali, Colombia: Escuela de Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente (EIDENAR) - Universidad del Valle.
- Singh, R., Bahuguna, A., Chauhan, P., Kumar, V., Kaur, S., Kumar, S., & Khan, A. (2016). Production, purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from soil isolate *Bacillus* sp. strain B-10. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 37-43.
- Sundberg, C., Smars, S., & Jonsson, H. (2004). Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic. *Bioresource Technology*, 145-150.

Sztern, D., & Pravia, M. (1999). Manual para la elaboración de compost: bases conceptuales y procedimiento. Organización Panamericana de la Salud - OPS/HEP/HES/URU/02.99.

Tabatabai, M. A. (1982). En: Page, A.L., Miller, E.M., Keeney, D.R. (Eds.). *Methods of soil analysis. Part 2.*, 903-947. Chemical and Microbiological Properties, pp. 903-947. Soil Science Society of America, Inc. Madison.

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

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

Wilson, D. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 1-5.

Wong, J., & Fang, M. (2000). Effects of lime addition on sewage sludge composting process. *Water Research*, 3691-3698.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo 1: Reactivos Celulasa

#### **Reactivos utilizados para medida de actividad enzimática y preparación de curva patrón**

- **Tampón Acetato sódico 50mM, pH 5:** Disolver 0,681 gramos de acetato sódico trihidrato en 75 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 5 con ácido clorhídrico 1 N y enrasar hasta 100 mL con agua destilada.
- **Solución 1% CMC:** Solución de carboximetil celulosa sódica al 1% en tampón acetato sódico. La CMC se incorpora en el volumen de tampón adecuado mediante

agitación y temperatura moderada hasta total disolución. Se envasa en frasco con mosca incluida y se agita en el agitador magnético para su uso.

- **Reactivo DNS**

| <b>Componente</b>                          | <b>Cantidad</b>       |
|--|-----------------------|
| Ácido 3,5-dinitro salicílico               | 7,49 g/L              |
| NaOH                                       | 14 g/L                |
| Tartrato sódico-potásico.4H <sub>2</sub> O | 216,1 g/L             |
| Fenol 90%                                  | 5,37 g/L (o 5,6 mL/L) |
| Sulfito sódico                             | 0,7 g/L               |
| H <sub>2</sub> O destilada                 | Enrasar a 1L          |

El reactivo DNS se elabora disolviendo sus componentes, en el mismo orden en el que aparecen en la tabla anterior, en el 80% del volumen de agua destilada necesaria. Cada uno se adiciona una vez disuelto el anterior para evitar fenómenos de floculación. Posteriormente, se enrasa hasta el volumen adecuado y se toman 3 mL del reactivo para su valoración con ácido clorhídrico 0,1 N (solución con fenolftaleína al 1% como indicador). Cuando se utilizan volúmenes inferiores a 5-6 mL de ácido clorhídrico, se añade más hidróxido sódico al reactivo (2 gramos por cada mL de clorhídrico no utilizado). Conservar a temperatura ambiente en frasco topacio.

- **Soluciones glucosa (sólo recta patrón):**

- **500 µg/mL (20 mL):** Incorporar 0,01 gramos de glucosa a 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
- **375 µg/mL:** Tomar 7,5 mL de la solución anterior (500 µg/mL) e incorporar a tubo con 2,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
- **250 µg/mL:** Tomar 5 mL de la solución inicial (500 µg/mL) e incorporar a tubo con 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
- **125 µg/mL:** Tomar 5 mL de la solución anterior (250 µg/mL) e incorporar a tubo con 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

## 7.2. Anexo 2: Reactivos $\beta$ -glucosidasa

### Reactivos utilizados para medida de actividad enzimática y preparación de curva patrón

- **Tampón universal modificado (MUB):**

- Solución MUB stock:

| Componente                           | Cantidad     |
|--------------------------------------|--------------|
| Tris-hidroximetil-aminometano (THAM) | 12,2 g       |
| Ácido maléico                        | 11,6 g       |
| Ácido cítrico                        | 14 g         |
| Ácido bórico                         | 6,28 g       |
| NaOH 1M (40g NaOH/L)                 | 488 mL       |
| H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>        | Enrasar a 1L |

Disolver los componentes en orden en aproximadamente 500 mL de agua destilada, incorporar NaOH y enrasar con agua destilada.

La solución se debe almacenar a 4 °C hasta 6 semanas.

- **Tampón MUB-HCl pH 6:** Mezclar 200 mL de solución MUB stock con 500 mL de HCl 0,1M y enrasar a 1 litro con agua destilada. Almacenar a 4 °C hasta 3 semanas.

- **Solución THAM 0,1M, pH 10:** Pesar 12,2 gramos de THAM (Tris-hidroximetil-aminometano), disolver en aproximadamente 800 mL de agua destilada y enrasar a 1 litro.
- **Solución THAM-NaOH 0,1M, pH 12 (solución extractante):** Pesar 12,2 gramos de THAM (Tris-hidroximetil-aminometano), disolver en aproximadamente 800 mL de agua, ajustar a pH 12 con NaOH 0,5 M y enrasar a 1 litro.
- **pNPG 25mM: Solución p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido 0,025M:** Disolver 0,377 gramos de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) en 50 mL de tampón MUB-HCl pH6. Almacenar a 4 °C durante una semana como máximo
- **CaCl<sub>2</sub> 2M:** Disolver 58,8 gramos de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O en aproximadamente 160 mL de agua destilada y enrasar a 200 mL con agua destilada.
- **NaOH 0,5M:** Disolver 20 gramos de NaOH en 800 mL de agua destilada y enrasar a 1 litro con agua destilada.
- **Soluciones p-nitrofenol (pNP) (sólo para la recta patrón):**
  - **200  $\mu$ g/mL:** Incorporar 1,44 mL de solución standard 10mM a 8,56 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
  - **100  $\mu$ g/mL:** Tomar 5 mL de la solución anterior (200  $\mu$ g/mL) e incorporar a tubo con 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
  - **50  $\mu$ g/mL:** Tomar 5 mL de la solución anterior (100  $\mu$ g/mL) e incorporar a tubo con 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
  - **25  $\mu$ g/mL:** Tomar 5 mL de la solución anterior (50  $\mu$ g/mL) e incorporar a tubo con 5mL de H<sub>2</sub>O destilada.

### 7.3. Anexo 3: Reactivos Amilasa

#### Reactivos utilizados en reacción enzimática y preparación de curva patrón

- **Tampón Sorensen (tampón fosfato) 0,5M, pH 5,5 (1L):** Pesar 2,1 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 37,2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en vaso de precipitado de 1 L y disolver en 800 mL de agua destilada con ayuda de agitación, enrasar a 1 litro. Comprobar el pH.
- **Solución de sustrato de almidón soluble al 1% (1L):** Pesar 10 gramos de almidón soluble, disolver en 500 mL de agua calentar en microondas hasta solubilización (agitar de vez en cuando) y enrasar a 1000 mL.
- **Soluciones de glucosa (sólo recta patrón):**
  - o **500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (20 mL):** Incorporar 0,01 gramo de glucosa a 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
  - o **375  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :** Tomar 7,5 mL de la solución anterior (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incorporar a tubo con 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
  - o **250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :** Tomar 5 mL de la solución inicial (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incorporar a tubo con 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
  - o **125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ :** Tomar 5 mL de la solución anterior (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incorporar a tubo con 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.