

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**  
**Grado en Biotecnología**  
**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**Curso académico: 2020-2021**

**Evolución de Grupos microbianos  
funcionales en el co-compostaje del  
alga invasora *Rugulopteryx  
okamurae* y residuos vegetales**



**Autor: David Ferrer Zamora**  
**Director: Juan Antonio López González**  
**Codirector: María Luz Segura Pérez**  
**Departamento de Biología y Geología**  
**Área de Microbiología**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA**

Consejería de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Desarrollo Sostenible



# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al profesor Joaquín Moreno, por brindarme esta oportunidad y creer en mí desde el principio. Gracias por sus consejos a lo largo de toda la carrera, que me han ayudado y me ayudarán siempre. Fue un placer tenerle como profesor, especialmente por su pasión y su forma de contagiarla a los alumnos, haciendo que aprendiésemos con una simple conversación, y siempre dispuesto a ayudar. Sin duda, para mí es un referente profesional y personal. Mi gusto y deseo de continuar en microbiología se lo debo a él.

A M.<sup>a</sup> José López, por estar ahí para sacar lo mejor de mí y de mi trabajo, haciéndome sentir en casa cuando estaba en el laboratorio.

A Juan, mi director, por estar a mi lado y ayudarme en todo lo posible. Agradezco tu dedicación y las horas invertidas para que el proyecto salga adelante, en especial con los contratiempos causados por la pandemia. Muchas gracias por tu positividad, que ha hecho que los errores se resolvieran rápido y sin mayor problema.

A M.<sup>a</sup> Luz, mi codirectora, por seguir mi trabajo de cerca e interesarse en todo momento en él, y darme la oportunidad de trabajar con ella en el centro de investigación. Gracias por ampliar mis conocimientos técnicos y mejorar mi capacidad de organización.

Por supuesto a Paqui, por dejarme pertenecer a este gran grupo que es el grupo de investigación de microbiología, y estar siempre dispuesta a sacar lo mejor de mí, sacando tiempo de forma imposible.

No me puedo olvidar de alguien fundamental en todo este trabajo, M.<sup>a</sup> José Estrella, ya que sin su ayuda no habría sido posible terminar este trabajo. Gracias por aguantar esos mensajes a cualquier hora, ayudarme a preparar material y sacrificar tiempo incluso en fin de semana para poder ayudar. Tú optimismo y energía son contagiosos, y cualquiera que trabaje contigo tiene mucha suerte.

A Macarena, por estos años en el laboratorio a mi lado, y por hacerme sentir tan a gusto trabajando y aprendiendo a tu lado, y por esas conversaciones tan entretenidas.

Del mismo modo, no me puedo olvidar de otros compañeros de laboratorio que me han ayudado y aguantado durante todo el trabajo: Jesús, María Rosa, Rosario, Ana Siles, Ana Toribio, que me han hecho sentirme en casa. Y por supuesto, a M.<sup>a</sup> del Mar, Paloma y Ángela, por

ayudarme siempre que tenían tiempo y aguantar todos los tubos y matraces que dejaba a mi paso.

Durante estos cuatro años de carrera, hay personas que llegaron en el momento justo y me han ayudado en todo momento, por lo que les estoy más que agradecido: Patricia, Anahis, José Luna, Gema, y muchos más. Gracias por cuidarme y apoyarme en todo momento, sin duda siempre estaremos en contacto y espero que terminemos trabajando juntos algún día.

Gracias a Denisa, por aguantar las quejas y explicaciones de todos los temas y asignaturas, a distancia y de forma presencial, en todo momento desde hace ya varios años.

Para acabar, me tengo que dirigir a un pilar fundamental en mi vida, mi familia. En especial a mis padres y mi hermana, pero sin olvidar a mis abuelos, tíos y primos (y las preguntas incesantes de Alfonso). Gracias por darme ánimos y apoyarme cuando las cosas no me iban bien, y alegrarse conmigo cuando éstas salían bien. Gracias a mi madre, por escucharme sin tener ni idea de lo que le hablo, y que busca cosas para tener más temas de conversación y entender lo que le digo. A mi padre, por estar ahí siempre, a pesar de no entender del todo lo que le digo, haciendo que me aprendiese las cosas mejor para poder explicar mejor. Y, por último, a mi hermana Virginia, por ayudarme a distraerme, estar siempre a mi lado y tratar de ayudarme siempre que puede. Tus alumnos son muy afortunados de tenerte como profesora.

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

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| Resumen .....   | 1  |
| Abstract.....   | 2  |
| 1.    Introducción .....  | 3  |
| 1.1. <i>Rugulopteryx okamurae</i> : el alga invasora .....                  | 3  |
| 1.2.    Problemática actual.....  | 4  |
| 1.3.    El compostaje .....   | 5  |
| 1.3.1.    Fases del proceso de compostaje .....                             | 6  |
| 1.3.2.    Biofertilizantes .....  | 7  |
| 1.3.3.    Microorganismos con capacidad biofertilizante en el compost ..... | 8  |
| 1.3.3.1.    Ciclo del Nitrógeno .....                                       | 8  |
| 1.3.3.2.    Solubilizadores de fosfato .....                                | 9  |
| 1.3.3.3.    Solubilizadores de potasio .....                                | 9  |
| 1.3.3.4.    Sideróforos: quelantes de hierro .....                          | 10 |
| 2.    Objetivos .....   | 10 |
| 3.    Materiales y métodos .....  | 11 |
| 3.1.    Localización ensayo, dispositivo experimental y proceso.....        | 11 |
| 3.2.    Medios de cultivo .....   | 14 |
| 3.3.    Métodos de siembra y lectura de resultados.....                     | 19 |
| 3.3.1.    Bacterias, hongos y actinobacterias.....                          | 20 |
| 3.3.2.    Fijadores de nitrógeno .....                                      | 20 |
| 3.3.3.    Solubilizadores de fosfatos y potasio.....                        | 20 |
| 3.3.4.    Sideróforos .....   | 20 |
| 3.3.5.    Nitrificantes.....  | 21 |
| 3.3.6.    Amonificantes .....   | 21 |
| 3.3.7.    Desnitrificantes .....  | 21 |
| 3.4.    Análisis estadístico .....  | 22 |
| 4.    Resultados .....  | 22 |
| 4.1.    Parámetros de control .....   | 22 |
| 4.2.    Bacterias Mesófilas .....   | 24 |
| 4.3.    Bacterias Termófilas.....   | 25 |
| 4.4.    Hongos Mesófilos.....   | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 4.5 Hongos Termófilos .....                 | 28 |
| 4.6 Actinobacterias Mesófilas .....         | 29 |
| 4.7 Actinobacterias Termófilas .....        | 31 |
| 4.8 Fijadores de nitrógeno .....            | 32 |
| 4.9 Solubilizadores de Fosfatos.....        | 34 |
| 4.10 Solubilizadores de Potasio .....       | 35 |
| 4.11 Productores de Sideróforos .....       | 36 |
| 4.12 Desnitrificantes .....                 | 38 |
| 4.13 Amonificantes .....                    | 39 |
| 4.14 Nitrificantes.....                     | 40 |
| 4.15 Tratamiento estadístico de datos ..... | 41 |
| 5. Conclusiones: .....                      | 44 |
| 6. Bibliografía .....                       | 45 |
| 7. Anexos .....                             | 1  |

## Resumen

La llegada del alga invasora *Rugulopteryx okamurae* a las costas españolas está causando estragos en la fauna, flora y afecta a la economía de las zonas afectadas. Tal es su velocidad de propagación que, en los últimos años, ha invadido prácticamente toda la costa andaluza. Por este motivo se han buscado alternativas para su retirada y posible uso ulterior. Es justo en este punto donde surge el compostaje como proceso de tratamiento eficaz y seguro.

El principal objetivo de este trabajo fue la caracterización de los distintos grupos microbianos de interés agronómico implicados en el compostaje del alga *R. okamurae*, y su evolución durante el proceso. Para ello, se ha llevado a cabo la formación de tres pilas de compostaje distintas que emplean poda de jardinería y restos hortícolas como agentes acondicionadores del alga. Durante el compostaje se midieron, tanto parámetros control del proceso para conocer el funcionamiento del proceso, como microbiológicos para sopesar la capacidad biofertilizante de los materiales sometidos al proceso.

Finalmente, tras el análisis de los resultados, la dificultad de compostaje del alga quedo patente. Pero, pese a esto, en el compost producido en el trabajo, existieron un alto número de amonificantes y nitrificantes junto a fijadores de nitrógeno, lo cual indica la elevada importancia de la microbiota asociada al ciclo del nitrógeno; así como, la presencia de agentes solubilizadores de fósforo, potasio, y sideróforos en el producto final, realzando sus capacidades biofertilizantes.

Palabras clave: *Rugulopteryx okamurae*, compostaje, compostaje alga, economía circular.

## Abstract

The arrival of the invasive algae *Rugulopteryx okamurae* to the coasts of Spain has caused significant damage to the fauna and flora. Even the economy of the affected zones was damaged due to its high invasive capability, invading Andalucía's coasts in the last years. As a result, alternatives for its removal and use have been search. At this point is were composting appears as a safe and effective process.

The main goal of this project was the characterization of the different microbial groups of agronomical interest implied in the composting process of *R. okamurae* and its variation along the process. For this, 3 different piles have been conformed using pruning and horticultural residues to condition the pile. During the process, several parameters were measured, control as well as microbiological parameters for the biofertilizing capacity of the materials.

Finally, after the analysis of the results, the composting difficulty of the algae was made clear. But, even though this difficulty, a high number of ammonia-oxidizing, nitrite-oxidizing as well as nitrogen-fixing organisms existed, indicating the huge importance of the microbiome related to the nitrogen cycle; furthermore, the presence of phosphate and potassium solubilizers, and siderophores in the final product enhances the biofertilizing abilities.

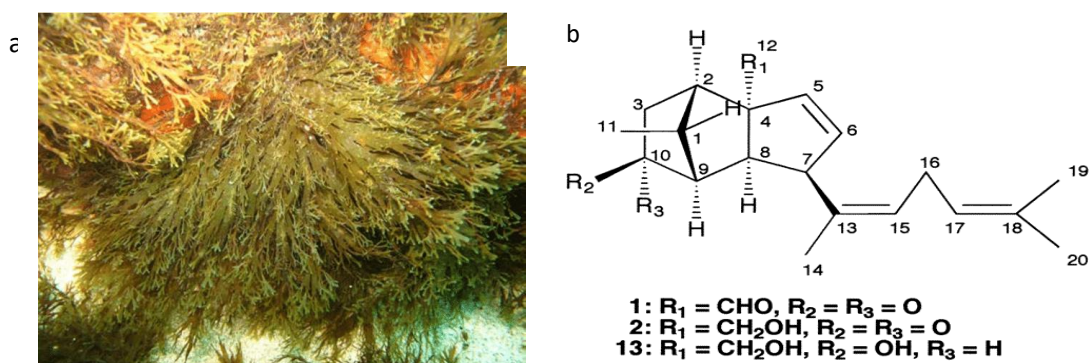
Key words: *Rugulopteryx okamurae*, composting, algae composting, circular economy.



## 1. Introducción

### 1.1. *Rugulopteryx okamurae*: el alga invasora

*Rugulopteryx okamurae* pertenece a la familia *Dictyotaceae* (Figura 1.1 a) originaria del océano Pacífico, especialmente de las costas de Japón, China y Corea. Esta alga parda suele encontrarse principalmente en sustratos rocosos a profundidades de entre 0,5 y 5 metros pero puede llegar a hacerlo a más de 30 metros de profundidad (García-Gómez et al., 2018). En lo que respecta a su ciclo reproductivo, puede propagarse de forma sexual o en forma de propágulos (pequeños trozos de cuerpo vegetativo) mediante las corrientes, permitiendo una rápida expansión (Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Desarrollo Sostenible, 2018).

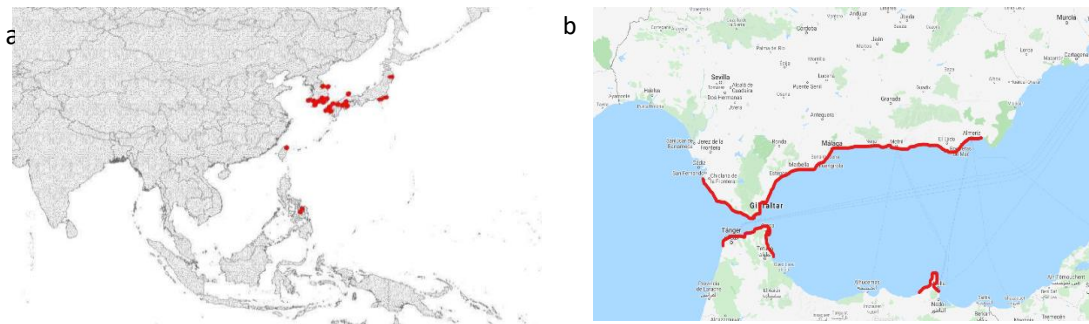


**Figura 1.1.** a. *R. okamurae* sobre sustrato rocoso en zona de crecimiento original (Román-Muñoz et al., 2019). b. Estructura de los sesquiterpenos producidos por *R. okamurae* (Suzuki et al., 2002).

Los principales compuestos de alelopatía e inhibición de la herbivoría, que impiden su uso como refugio por parte de las especies autóctonas y reduce su capacidad como alimento, son los sesquiterpenos (Figura 1.1. b) y diterpenos (García-Gómez et al., 2018; Ninomiya et al., 1999). Estos compuestos son conocidos por sus cualidades bioactivas anti-herbívora, antibiótica, antifúngica y citotóxica, por lo que son un gran peligro para las especies locales. De hecho, no se han encontrado especies herbívoras que se alimenten de ella en la zona del estrecho de Gibraltar. Además de estos metabolitos secundarios, también genera metanol y cloroformo, los cuales son responsables de los malos olores generados por el alga y la disminución de especies que lo usan los entornos en los que está presente como hábitat (García-Gómez et al., 2018). En definitiva, se trata de un organismo que presenta un alta recalcitrancia para su degradación.

En 2002, se detectó por primera vez en el océano Atlántico, más concretamente en la laguna costera de Étang de Thau (Francia). Su aparición en este lugar se debió a un accidente medioambiental causado por la liberación de unas ostras utilizadas para acuicultura procedentes de Japón (Figura 1.2 a). En 2015, *R. okamurae* había llegado al estrecho de Gibraltar a pesar de tener reportes previos en la zona de Ceuta, pero no se elaboró ni se investigó más

debido a su gran parecido con las especies autóctonas. Dado que se encuentra fuera de su ecosistema, se considera que se trata de una especie invasora debido a la idoneidad del terreno, al rango de temperaturas para su crecimiento y a la gran cantidad de luz solar recibida en la zona. Esta alga está desplazando a las especies autóctonas, por competición por el terreno y la cantidad de compuestos antimicrobianos y otros productos que dificultan su digestión, causando grandes cambios en el ecosistema que suponen un gran perjuicio para la fauna autóctona, en especial para crustáceos y mariscos (Navarro-Barranco et al., 2019).



**Figura 1.2.** a. Zona de origen del alga *R. okamurae* (Altamirano, 2020). b. Extensión actual del alga *R. okamurae* en las costas españolas y del estrecho (Maps, 2021)

En la actualidad, se estima que se ha extendido desde la zona de Chicla de las Arenas hasta la costa de Almería (Figura 1.2. b) puesto que se adapta fácilmente y de manera efectiva a los sustratos tanto naturales (zonas rocosas) como artificiales (residuos, cuerdas de barcos, etc.) que se encuentra en su camino (Figueras Huerta, 2020).

## 1.2. Problemática actual

*Rugulopteryx okamurae* causa problemas económicos de relevancia debido a la aparición de baja salubridad de las playas siendo el sector turístico el más afectado, además de causar problemas pesqueros debido a la disminución de especies autóctonas y al deterioro del material provocado por el propio alga y la dificultad que presenta para ser retirada de los lugares invadidos (Figura 1.3) (Figueras Huerta, 2020).



**Figura 1.3.-** Arribazón del alga a costas gaditanas (Figueras Huerta, 2020)

En cuanto a la implicación medioambiental, esta alga desplaza de forma significativa a las especies autóctonas mediante competición por el sustrato necesario para que se arraiguen y, por ende, puedan recibir luz. Al tratarse de una especie invasora, no presenta ningún depredador natural en la zona. Así mismo, debido a los distintos compuestos que genera, reduce ampliamente las poblaciones de crustáceos y moluscos (Navarro-Barranco et al., 2019). Su arribazón en costas produce problemas de oscurecimiento entre otros, lo que dificulta la vida marina, así como disminuye la capacidad de las aves marinas para la caza y su alimentación. Además, crea problemas de salubridad, lo que causa problemas a la flora y fauna de las zonas costeras (Figura 1.3) que se ven expuestas a estas condiciones (Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Desarrollo Sostenible, 2018).

### 1.3. El compostaje

El compostaje se define como un proceso de biotransformación aerobia de la materia orgánica en un producto estable y maduro llamado compost, el cual puede utilizarse como enmienda orgánica para suelos agrícolas. Durante dicho proceso, se produce la sucesión de etapas inducidas por la metabolización de los diversos tipos de sustratos por parte de las diferentes poblaciones microbianas (Han et al., 2014). A lo largo del proceso, existen una serie de parámetros físico-químicos que deben ser monitorizados para comprobar la evolución del mismo y, en los casos que sea necesario, corregir las desviaciones que se produzcan en estos. Algunos de estos parámetros son: temperatura, humedad, relación C/N o aireación (Siles-Castellano et al., 2020).

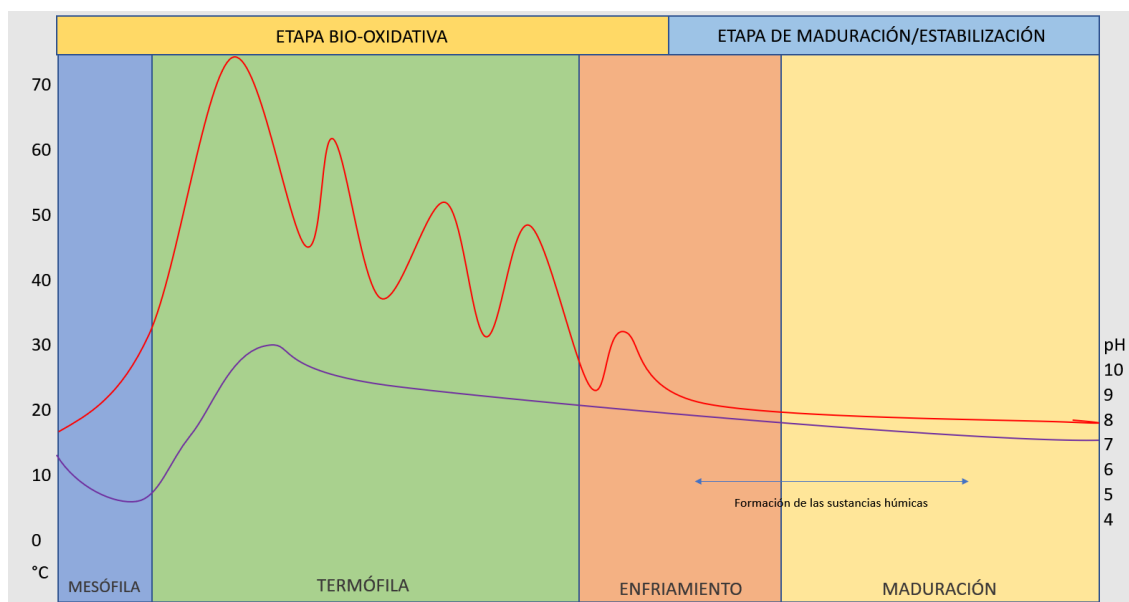
Este proceso idealmente se ha de realizar con una relación Carbono/Nitrógeno de 30 (Zhu, 2007), para optimizar el crecimiento de los microorganismos, además de evitar la pérdida de nitrógeno en forma de amoníaco (que causa malos olores), poco deseables en el proceso (Han et al., 2014), aunque se puede realizar a ratios menores. Con alta frecuencia, los materiales a compostar no reúnen las condiciones ideales en este parámetro, por lo que, se recurre al co-compostaje. Para compuestos con una ratio baja de C/N, es necesario añadir un material con una alta cantidad de C como acondicionador y estructurante. Para ello, se emplean materiales tales como restos orgánicos de deshechos animales, restos de jardinería o restos hortícolas. Además, una tasa alta de humedad puede producir zonas de anoxia, lo cual fomenta el desarrollo de procesos anaerobios como la proliferación de actividades desnitrificantes, no deseables para el proceso. La falta de humedad también puede causar problemas para la supervivencia de los microorganismos, así como, una aireación excesiva impide la subida de la temperatura de la pila.

Entre los compuestos orgánicos susceptibles de ser degradados se encuentran polímeros complejos como la lignocelulosa. En la etapa final del proceso, se producen una gran cantidad de reacciones de condensación y polimerización molecular que conducen a la formación de compuestos estables y no biodegradables, denominados complejos lignina-humus, esto es, la

fracción húmica (López-González et al., 2013). Esta etapa puede durar varios meses, durante los cuales la biodegradación de moléculas recalcitrantes, o poco biodegradables, se produce de forma muy lenta, mientras que la materia orgánica parcialmente degradada se reestructura para dar lugar a la formación de sustancias húmicas (Qiao et al., 2019). Esto ocurre debido a la acción enzimática presente en los microorganismos tales como xilanasas, proteasas, celulasas, ligninasas y lipasas que modifican la estructura de los nutrientes poliméricos.

### 1.3.1. Fases del proceso de compostaje

El proceso se puede clasificar en cuatro etapas térmicas caracterizadas por su actividad microbiana y enzimática. Aunque también es posible dividir el proceso de compostaje en dos etapas globales: Etapa bio-oxidativa y etapa de maduración (Montoya et al., 2020). Dichas etapas térmicas se pueden ver en la Figura 1.4.



**Figura 1.4.** Evolución del proceso de compostaje (Modificada de Moreno y Mormeneo, 2011).

- **Fase mesófila:** La materia prima comienza a degradarse por acción de los microorganismos mesófilos y termotolerantes. Se genera un crecimiento exponencial debido al uso de azúcares y otros compuestos de fácil asimilación (Sánchez et al., 2017). Como consecuencia, se producen ácidos orgánicos que disminuyen el pH a valores cercanos a 5,8 (López-González et al., 2015; Montoya et al., 2020). La temperatura empieza a subir de forma rápida superando los 45 °C (Jurado et al., 2015).
- **Fase termófila:** El aumento de la temperatura es causado por el metabolismo de los microorganismos presentes, llegando a alcanzarse temperaturas superiores a los 55 °C. De hecho, pueden llegar a los 65-70 °C, durante incluso dos semanas, con la

consecuente eliminación de patógenos (Han et al., 2014). Además, la temperatura está relacionada con la emisión de CO<sub>2</sub> (de Guardia et al., 2010). Los microorganismos asociados a etapa, conocidos como microorganismos termófilos y termotolerantes, producen enzimas degradadoras de hemicelulosa, celulosa y proteínas (Sánchez et al., 2017). En cuanto al pH, este aumenta hasta valores alcalinos de 8,6-8,7, como consecuencia de la degradación de proteínas y la consiguiente liberación de grupos amino al medio (Montoya et al., 2020).

- **Fase de Enfriamiento:** Durante esta fase se produce la reducción paulatina de la temperatura debido al descenso de la actividad metabólica, predominando los microorganismos termotolerantes. Pese a esto, se genera la posibilidad de recolonización por parte de mesófilos adaptados a las nuevas condiciones nutricionales. Se degradan compuestos más complejos, como la lignina (López-González et al., 2015). Además, aumentan los niveles de microorganismos nitrificantes, lo que genera un aumento de los niveles de nitrógeno (Bonito et al., 2010).
- **Fase de maduración:** Como resultado de esta etapa se obtiene un producto final humificado llamado compost, gracias a la estabilización y a la mineralización de la materia orgánica. Los hongos cobran importancia ya que son grandes implicados en el proceso de humificación del material (López-González, 2015). Se obtiene así un pH final en torno a 7-8 (Bonito et al., 2010; López-Gonzalez et al., 2013) y una ratio típica C/N de 15 (Kumar et al., 2010), es decir, un producto listo para su uso como sustrato o abono cumpliendo la normativa vigente (RD 999/2017).

### 1.3.2. Biofertilizantes

Los biofertilizantes son productos que, gracias a la presencia de microorganismos, movilizan distintos nutrientes mediante una serie de transformaciones biológicas, mejorando así las características del suelo y, por ende, de los cultivos (Mącik et al., 2020). Algunas actividades que llevan a cabo los microorganismos biofertilizantes son la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfatos, potasio, la quelación de hierro o la producción de sustancias tales como fitohormonas y vitaminas (Negi et al., 2021). Los ciclos biogeoquímicos son mostrados en los Anexos. Esta microbiota, además, es altamente respetuosa con el medio ambiente, por lo que, son preferibles a los fertilizantes químicos clásicos.

El principal producto clasificado como biofertilizante es el compost. La incorporación de este al suelo da lugar a una mayor absorción de nutrientes, debido a la biotransformación de

componentes hacia formas utilizables por las plantas (fósforo, potasio, nitrógeno, hierro); reduce la contaminación por patógenos al reducir el alimento disponible; además de una reducción de las emisiones de  $N_2O$  y  $NH_3$  (Sun et al., 2021). Todo esto sin generar cambios en el suelo, generando un número mínimo de residuos y siendo capaz de utilizar restos o despojos de plantas y animales.

### 1.3.3. Microorganismos con capacidad biofertilizante en el compost

El valor de un compost como fertilizante va en relación con la cantidad de microorganismos funcionales que posee, ya que estos son fundamentales para la mineralización y movilización de los componentes del suelo (Sánchez et al., 2017). Los ciclos biogeoquímicos son vitales para la vida en la tierra, y pasos fundamentales de estos se llevan a cabo exclusivamente por microorganismos. Un ejemplo de esto se produce en el ciclo del nitrógeno, cuya fijación es exclusiva de bacterias, y sin las cuales no existirían fuentes disponibles para el resto de seres vivos. Pero también sucede en los ciclos de potasio y fosfatos, los cuales sin la intervención de microorganismos sufrirían una insolubilización progresiva hasta dejar de estar disponibles. Por todo esto, los microorganismos son fundamentales para la vida; además de llevar a cabo una gran labor degradativa de compuestos poco biodisponibles, tales como la celulosa, proteínas complejas, solubilizan el hierro para su utilización, entre muchas otras funciones indispensables. Además, protegen a los cultivos de las actividades de los patógenos (Negi et al., 2021; Sun et al., 2021).

#### 1.3.3.1. Ciclo del Nitrógeno

Este elemento es el más requerido por plantas y microorganismos. Es necesario para la síntesis de los aminoácidos, los ácidos nucleicos, y un largo etcétera. A pesar de esto, los eucariotas presentan importantes limitaciones para su asimilación y, por ello dependen de los microorganismos para obtenerlo. En el caso de las plantas, lo absorben en formas inorgánicas, tales como amonio o formas nítricas (Sánchez et al., 2017). Los ciclos biogeoquímicos se muestran en el Anexo 1.

- **Nitrificación:** es un proceso bio-oxidativo que favorece la obtención de nitrógeno. El amoníaco es transformado en nitrito, para ser transformado este en nitrato por acción de un segundo grupo de bacterias, aunque esta forma del nitrógeno se pierde más fácilmente por lixiviación (Jurado et al., 2014).

- **Amonificación:** en las primeras fases del proceso, las proteínas se hidrolizan por proteasas microbianas hasta aminoácidos. Estos aminoácidos, así como ácidos nucleicos y nucleótidos, son utilizados para la constitución de sus propias proteínas, excretando al medio el exceso como ion amonio, de modo asimilable por las plantas o disponible para la nitrificación. Por tanto, este proceso es claramente beneficioso para la fertilidad de suelos (Vargas-García et al., 2010).

- **Fijación de nitrógeno:** el nitrógeno es el componente mayoritario de la atmósfera como  $N_2$ , pero este solo es utilizable por las bacterias fijadoras de nitrógeno. Este proceso es llevado a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa. Con éste se rompe el triple enlace del nitrógeno molecular reduciéndose a amoníaco ( $NH_3$ ). Algunas de estas bacterias fijadoras son *Alcaligenes*, *Caulobacter* o *Klebsiella*, entre otros géneros (Sánchez et al., 2017). Pueden ser de vida libre, aunque también se encuentran con frecuencia asociadas a otros organismos, tales como *Rhizobium* en leguminosas.

- **Desnitrificación:** este proceso es uno poco deseable en el proceso de compostaje, ya que devuelve este elemento a la atmósfera, reduciendo los compuestos a óxido nitroso y nitrógeno atmosférico, mediante un proceso denominado reducción desasimilatoria del nitrato, de carácter anaerobio (Sun et al., 2021).

#### 1.3.3.2. Solubilizadores de fosfato

El fósforo tiene una gran importancia en el crecimiento y desarrollo debido a su papel como fosfolípidos, coenzimas, nucleótidos, etcétera. Sin embargo, es limitante al formar compuestos de poca solubilidad como fosfatos de calcio entre otros (Ciclo en Anexo 2). La disponibilidad de estos está marcada por el pH del suelo. Por tanto, la presencia de microorganismos capaces de solubilizarlo es vital para aumentar las cantidades de fósforo disponible para los cultivos (Montoya et al., 2020).

Esta solubilización se lleva a cabo mediante la secreción de ácidos orgánicos que actúan como quelantes, y disminuyen el pH del suelo por parte de los microorganismos, que son capaces de crecer en medios con apatita y otras fuentes de fósforo (Sánchez et al., 2017). Entre los microorganismos capaces de hacer esto se encuentran *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae* (Beltrán Pineda, 2014).

#### 1.3.3.3. Solubilizadores de potasio

El potasio forma parte de enzimas, coenzimas y proteínas. Además, favorece el movimiento del agua, nutrientes y carbohidratos en los tejidos de las plantas. La deficiencia de potasio se visualiza como una disminución del rendimiento y provoca enfermedad en los cultivos (Ahmad, 2016).

La mayor parte del potasio en el suelo se presenta en formas insolubles en minerales (Anexo 3), por lo tanto, no se encuentra directamente disponible para las plantas. Los microorganismos solubilizadores de potasio liberan este elemento mediante la secreción de ácidos orgánicos quelantes que lo solubilizan. Entre estos microorganismos destacan *Bacillus mucilaginosus* y *Aspergillus fumigatus* (Sánchez et al., 2017).



#### 1.3.3.4. Sideróforos: quelantes de hierro

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y vida de las plantas, al ser cofactor en múltiples enzimas y requerirse en procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa. Su deficiencia causa la interrupción de estos procesos y causa síntomas tales como la clorosis. Por todo esto, el acceso al hierro es esencial. El hierro se encuentra en el suelo como ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), siendo esta última forma la preferente en condiciones aeróbicas, pero forma hidróxidos insolubles (Ahmed et al., 2014).

Los cultivos obtienen hierro gracias a los productores de sideróforos, microorganismos capaces de quelar el hierro de forma irreversible. El ion férrico se une a estos compuestos sideróforos permitiendo su paso a ion ferroso, de carácter soluble. Contribuyen a la absorción de Mn, Mo, Ni y Co. Además, protegen de patógenos al disminuir el hierro disponible para estos (Ghosh et al., 2020). Destacan por su capacidad productora especies como *Penicillium citrinum* y *Aspergillus niger* (Baakza et al., 2004).

## 2. Objetivos

La entrada de especies invasoras supone un reto ambiental de gran envergadura para la sociedad. Para buscar posibles usos de esta alga produciendo un producto económico aprovechable que reduzca el coste de la eliminación de esta se pueden plantear una serie de alternativas. Una de las posibles soluciones es la creación de sustratos biofertilizantes a partir de la especie invasora, es decir, someter a un tratamiento de compostaje al alga. Este proyecto se suma a la idea de una economía circular mediante el aprovechamiento de residuos para la fertilización y crecimiento de alimentos reduciendo las pérdidas de material y, por tanto, dando lugar a una baja acumulación de residuos.

Este trabajo tiene como objetivo principal la caracterización de la evolución de los distintos grupos microbianos implicados en el compostaje del alga *Rugulopteryx okamurae*.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la variación de la microbiota fúngica, actinomicetal y bacteriana de carácter mesófilo y termófilo en el proceso de compostaje de *Rugulopteryx okamurae* y residuos vegetales.
2. Evaluar los grupos microbianos involucrados en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno.
3. Comprobar la presencia de agentes solubilizadores de fosfatos, potasio y sideróforos durante el proceso de compostaje del alga invasora.

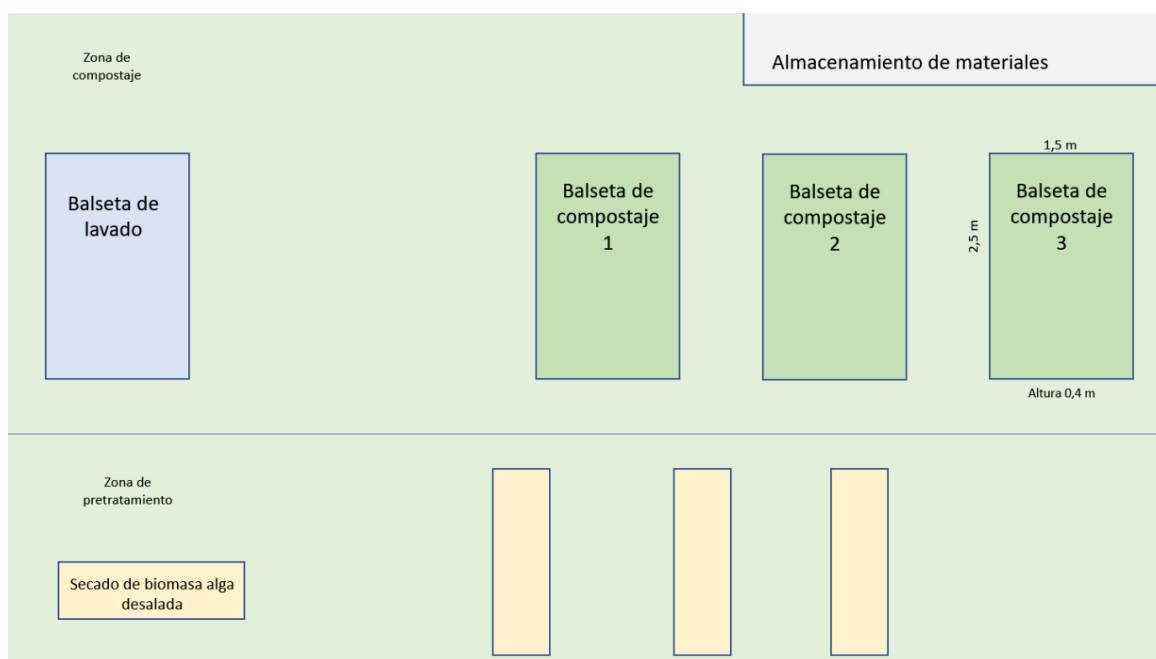


### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Localización ensayo, dispositivo experimental y proceso

El ensayo se realizó en el Centro de Investigación y Formación Agraria (IFAPA), La Cañada de San Urbano, Almería (Longitud: 2º 24' 03" W; Latitud: 36º 50' 13" N; Altitud: 5 m).

El dispositivo experimental se muestra en la Figura 3.1., y consta de una zona de recepción de los materiales, una zona de lavado y secado de las algas para su acondicionamiento previo al proceso de compostaje y la zona de compostaje como tal.



**Figura 3.1.-** Plano de la zona de compostaje.

Primero se realizó un pretratamiento del alga que consistió en un lavado para reducir el contenido en sales y arena. Posteriormente, previo a la creación de las pilas se dejó secar todo el material durante 4-10 días. No se realizó una rotura mecánica ni manual del alga. En la Tabla 3.1. se muestra la composición de las tres pilas de compostaje (de un volumen total de 1,6 m<sup>3</sup> cada una de media), así como la relación C/N de cada una de las pilas. La humedad se trató de mantener al 30-60%, la cual se encuentra dentro del rango adecuado para un proceso de este tipo (Estrella-González, 2020). En lo que respecta al ratio C/N, idealmente la relación C/N debe estar en torno a 25-30, siendo la pila denominada HOR la que más se aproximó a este valor (Tabla 3.1). Para conseguir los objetivos del proceso se realizaron mezclas de proporción variable del alga con residuos vegetales de poda y hortícolas (molidos previamente con un tamaño máximo de los elementos de 5 cm). Se mantuvo una pauta de volteo cada 7-14 días aproximadamente, y riego en función de la humedad, con el objetivo de evitar la anaerobiosis y promover la degradación del material.

| Mezcla | Material (1) | Volumen (%) | C/N   |
|--------|--------------|-------------|-------|
| AL     | Alga         | 100,00      | 10,20 |
|        | Jardinería   | 0,00        |       |
|        | Hortícola    | 0,00        |       |
| JAR    | Alga         | 33,00       | 18,16 |
|        | Jardinería   | 66,00       |       |
|        | Hortícola    | 0,00        |       |
| HOR    | Alga         | 33,00       | 20,50 |
|        | Jardinería   | 0,00        |       |
|        | Hortícola    | 66,00       |       |

**Tabla 3.1.-**Mezclas utilizadas para el estudio. 1: alga, restos del alga invasora; Jardinería, restos de poda de jardines; Hortícola, restos de especies hortícolas.

A lo largo del proceso se realizaron un total de 4 muestreos, de cada una de las pilas de compostaje, constituidas por 9 alícuotas estratégicamente localizadas para representar los diversos ambientes que coexisten en la pila. En cada muestreo, se cogieron, aproximadamente, 3 kg de muestra. Se realizó el procesamiento de la muestra de manera inmediata. Además, una décima parte de la muestra almacenó a 4 °C. El resto se etiquetó y se almacenó a -20 °C. Las muestras se rotularon y se ven reflejadas en el trabajo de la siguiente forma:

Muestra inicial: MPR, tomada el día 3 de noviembre de 2020.

Fase termófila: TER, tomada el día 2 de diciembre de 2020.

Fase de enfriamiento: ENF, tomada el día 8 de febrero de 2021.

Compost maduro, producto final: PRF, tomada el día 19 de abril de 2021.

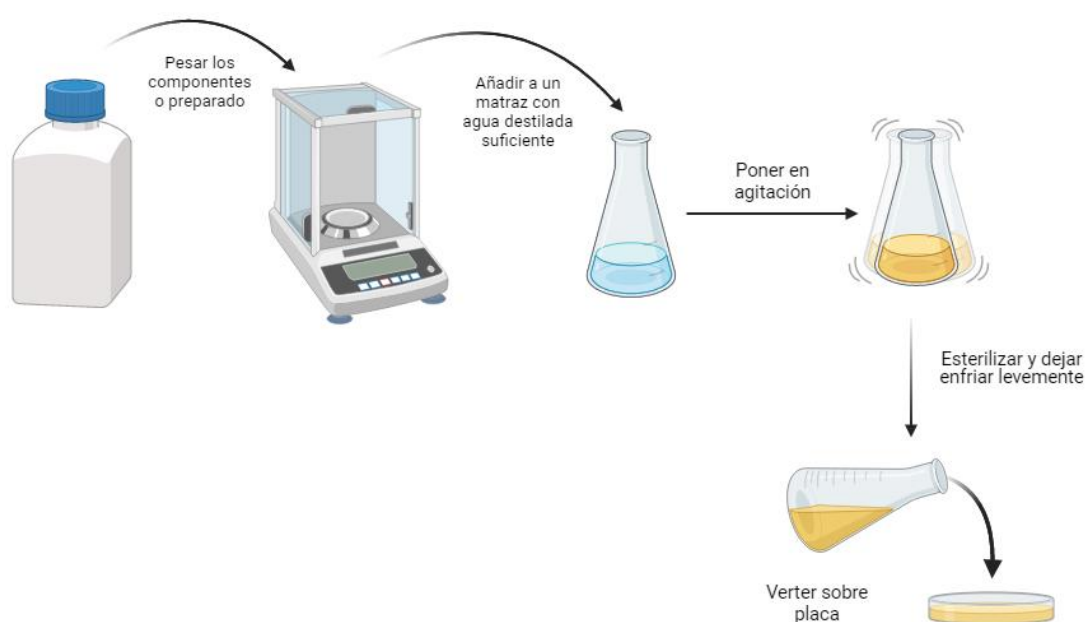
Estos muestreos se tomaron por suponer los puntos de cambio en las poblaciones microbianas presentes, desde su estado inicial (MPR), al producto final (PRF).



**Figura 3.2.-** Diseño experimental.

### 3.2. Medios de cultivo

En la Figura 3.3 se muestra el proceso de la preparación de medios y placas de cultivo que se detalla a continuación para cada medio usado en el trabajo.



**Figura 3.3.** Preparación de placas de cultivo.

#### APHA (PANREAC 413799.1210)

| Componente           | g/L |
|----------------------|-----|
| Extracto de levadura | 2,5 |
| d-Glucosa            | 1   |
| Caseína              | 5   |
| Agar                 | 15  |

**Tabla 3.2.** Componentes medio APHA

Se pesaron 23,5 gramos del preparado comercial (Tabla 3.2) y se disolvieron en 1 litro de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de la misma capacidad. Se autoclavó la mezcla para esterilizarla y, tras dejarla enfriar ligeramente, se vertió en placas Petri estériles.

### Rosa de Bengala (LiofilChem, 610090)

| Componente                           | g/L  |
|--------------------------------------|------|
| Agar                                 | 15   |
| Cloranfenicol                        | 0,1  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0,5  |
| Bosa Bengala                         | 0,05 |
| Peptona bacteriológica               | 5    |
| Glucosa                              | 10   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1    |

Tabla 3.3. Componentes medio rosa de bengala

Se pesaron 23,5 gramos del preparado comercial (Tabla 3.3) y se disolvieron en 1 litro de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de la misma capacidad. Se autoclavó la mezcla para esterilizarla y, tras dejarla enfriar ligeramente, se vertió en placas Petri estériles.

### Agar Caseinato Sódico (SCA)

| Componente                            | g/L   |
|---------------------------------------|-------|
| Caseinato sódico                      | 2     |
| Agar                                  | 20    |
| Asparagina                            | 0,1   |
| Na(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COO) | 4     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0,5   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,1   |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,001 |
| Glicerol                              | 5     |

Tabla 3.4. Componentes medio SCA

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.4 y estos se añadieron en un matraz de 1 L, enrasando hasta esta cantidad con agua destilada. Posteriormente, se autoclavó la mezcla para esterilizarla y, tras dejar enfriar brevemente, se vertió en placas Petri estériles.

### BURK sin nitrógeno

| Componente                            | g/L    |
|---------------------------------------|--------|
| Glucosa                               | 5      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,64   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0,16   |
| NaCl                                  | 0,2    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,2    |
| CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0,05   |
| NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,001  |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O  | 0,0025 |
| Agar                                  | 15     |

Tabla 3.5. Componentes medio BURK sin nitrógeno

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.5 y estos se vertieron en un matraz de 1 L, enrasando hasta esta cantidad con agua destilada. Posteriormente, se autoclavó la mezcla para esterilizarla y, tras dejar enfriar brevemente, se vertió en placas Petri estériles.

#### Medio de solubilizadores de fosfatos

| Componente                                | g/L   |
|---|-------|
| Glucosa                                   | 10    |
| $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$              | 5     |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 0,5   |
| NaCl                                      | 0,2   |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,1   |
| KCl                                       | 0,2   |
| Extracto de levadura                      | 0,5   |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  | 0,002 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,002 |
| Agar                                      | 15    |

Tabla 3.6. Componentes medio solubilizadores de fosfatos

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.6 y estos se vertieron en un matraz de 1 L, enrasando hasta esta cantidad con agua destilada. Posteriormente, se autoclavó la mezcla para esterilizarla y, tras dejar enfriar brevemente, se vertió en placas Petri estériles.

#### Medio Aleksandrow (Himedia, M1996-500G)

| Componente                                | g/L   |
|---|-------|
| Dextrosa                                  | 5     |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5   |
| $\text{FeCl}_3$                           | 0,005 |
| $\text{CaCO}_3$                           | 0,1   |
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$              | 2     |
| $\text{AlKO}_6\text{Si}_2$                | 2     |
| Agar                                      | 20    |

Tabla 3.7. Componentes medio Aleksandrow

Se pesaron 29,605 gramos del preparado comercial (Tabla 3.7) y se disolvieron en 1 litro de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de la misma capacidad. Se autoclavó la mezcla para esterilizarla, y tras dejarla enfriar ligeramente, se vertió en placas Petri estériles.

### Medio de productores de sideróforos

| Componente                               | cantidad/L |
|--|------------|
| Reactivo CAS (Chromeazurols)             | 60,5 mg    |
| HDTMA<br>(Hexadeciltrimetilaminobromuro) | 72,9 mg    |
| Fe3·6H2O 1mM                             | 10 mL      |
| Piperazina                               | 30,24 mg   |
| Agar                                     | 1,5%       |

**Tabla 3.8.** Componentes medio para la determinación de sideróforos

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.8 y estos se vertieron en un matraz de 1 L, enrasando hasta esta cantidad con agua destilada. Posteriormente, se autoclavó la mezcla para esterilizarla, y tras dejar enfriar brevemente, se vertió en placas Petri de plástico.

### Medio para crecimiento de Nitrificantes

| Componente                                      | Cantidad/L |
|---|------------|
| Solución salina de Winogradsky                  | 50 mL      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,5 g      |
| CaCO <sub>3</sub>                               | 7,5 g      |
| Agua destilada                                  | csp 1 L    |

**Tabla 3.9.** Componentes medio nitrificantes

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.9 y estos se vertieron en tubos de cristal finos, una cantidad de 9 mL por tubo. Posteriormente se taparon y esterilizaron mediante autoclave.

### Medio para Amonificantes

| Componente                     | Cantidad/L |
|--------------------------------|------------|
| Solución salina de Winogradsky | 50 mL      |
| Asparagina                     | 0,2 g      |
| Solución de oligoelementos     | 1 mL       |
| Agua destilada                 | csp 1 L    |

**Tabla 3.10.** Componentes medio amonificantes

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.10 y estos se vertieron en tubos de cristal finos, una cantidad de 9 mL por tubo. Posteriormente se taparon y esterilizaron mediante autoclave.

### Medio crecimiento de desnitrificantes

| Componente                     | Cantidad/L |
|--------------------------------|------------|
| Solución salina de Winogradsky | 50 mL      |
| Solución de oligoelementos     | 1 mL       |
| Glicerol                       | 10 g       |
| Extracto de Levadura           | 3 g        |
| Peptona                        | 5 g        |
| KNO <sub>3</sub>               | 1 g        |
| Rojo fenol 0,04%aq             | 20 mL      |
| Agua destilada                 | csp 1 L    |

Tabla 3.11. Componentes medio desnitrificantes

Se pesaron todos los componentes listados en la Tabla 3.11 y estos se vertieron en tubos de cristal finos, una cantidad de 4,5 mL por tubo. Posteriormente se taparon y esterilizaron mediante autoclave.

### Reactivo para revelado de nitrificantes 1

| Componente                     | Cantidad/L |
|--------------------------------|------------|
| Difenilamina                   | 1 g        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 100 mL     |

Tabla 3.12. Componentes reactivo nitrificantes 1

Se pesaron y se mezclaron todos los componentes listados (Tabla 3.12) y se almacenó en frío hasta su uso en botes topacio.

### Reactivo para revelado de nitrificantes 2

| Componente                     | Cantidad/L |
|--------------------------------|------------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 98%        |

Tabla 3.13. Componentes reactivo nitrificantes 2

Se pesó el componente listado (Tabla 3.13) y se almacenó en frío hasta su uso en botes topacio.

### Reactivo de Nessler 1

| Componente       | Cantidad/L |
|------------------|------------|
| HgI <sub>2</sub> | 50         |
| KI               | 36,5       |
| Agua destilada   | csp 1 L    |

Tabla 3.14. Componentes reactivo Nessler 1

Se pesaron y se mezclaron todos los componentes listados (Tabla 3.14) y se almacenó en frío hasta su uso en botes topacio.



### Reactivo de Nessler 2

| Componente     | Cantidad/L |
|----------------|------------|
| KOH            | 150        |
| Agua destilada | csp 1 L    |

Tabla 3.15.- Componentes reactivo Nessler 2

Se pesaron y se mezclaron todos los componentes listados en la Tabla 3.15 y se almacenó en frío hasta su uso en botes topacio.

### 3.3. Métodos de siembra y lectura de resultados

En la Figura 3.4 se detalla el proceso y cantidades usadas para realizar las diluciones y posterior siembra de los medios en placa, mientras que en la Figura 3.5 se muestra la siembra para los medios en tubo.

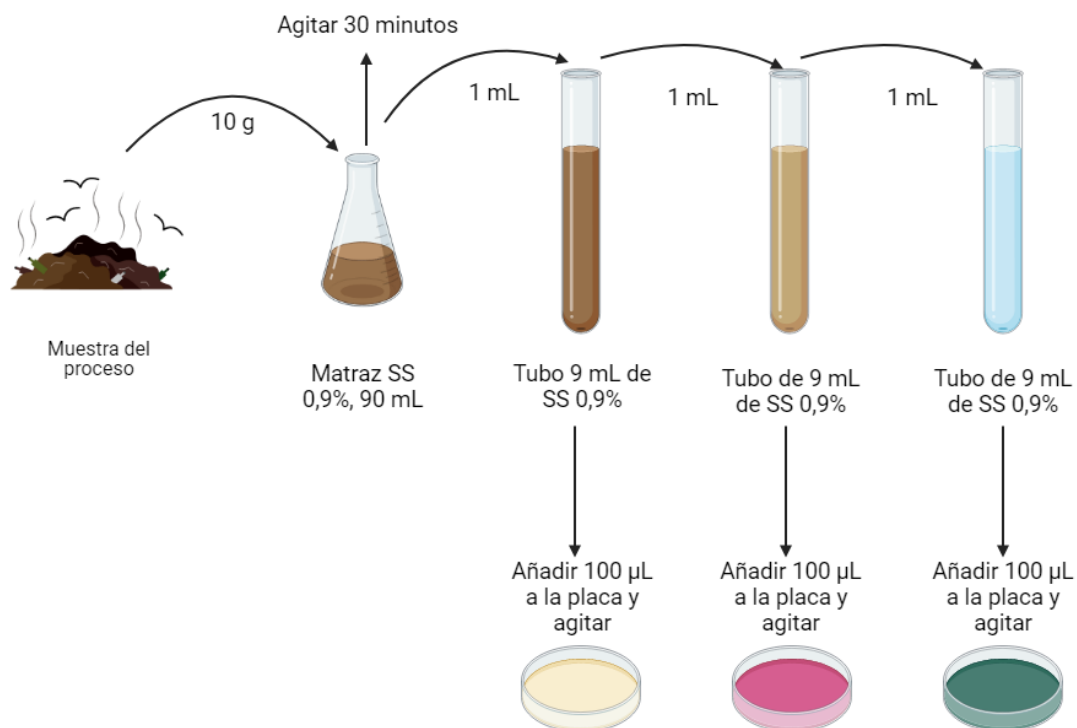


Figura 3.4.- Método de dilución y siembra de placas.

Para el recuento de unidades formadoras de colonias se usó la Fórmula 1:

$$UFC/mL = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias}}{V \times 10^{\text{dilución usada}}}$$

Fórmula 1.- Cálculo de unidades formadoras de colonias por mL

### 3.3.1. Bacterias, hongos y actinobacterias

Para la siembra y recuento de bacterias, hongos y actinobacterias mesófilas y termófilas, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L (a distintas diluciones según la muestra y el grupo a medir) que se vertió sobre el medio sólido (APHA, rosa de bengala y SCA respectivamente). Se añadieron unas esferas de cristal de sílice para repartir. Las placas se dejaron incubar durante 24 horas para bacterias y 48 horas para los otros dos grupos, a 30 y 50 °C para mesófilos y termófilos respectivamente. Posteriormente se realizó un recuento de las colonias visibles, contando cada una como una unidad formadora de colonias.

### 3.3.2. Fijadores de nitrógeno

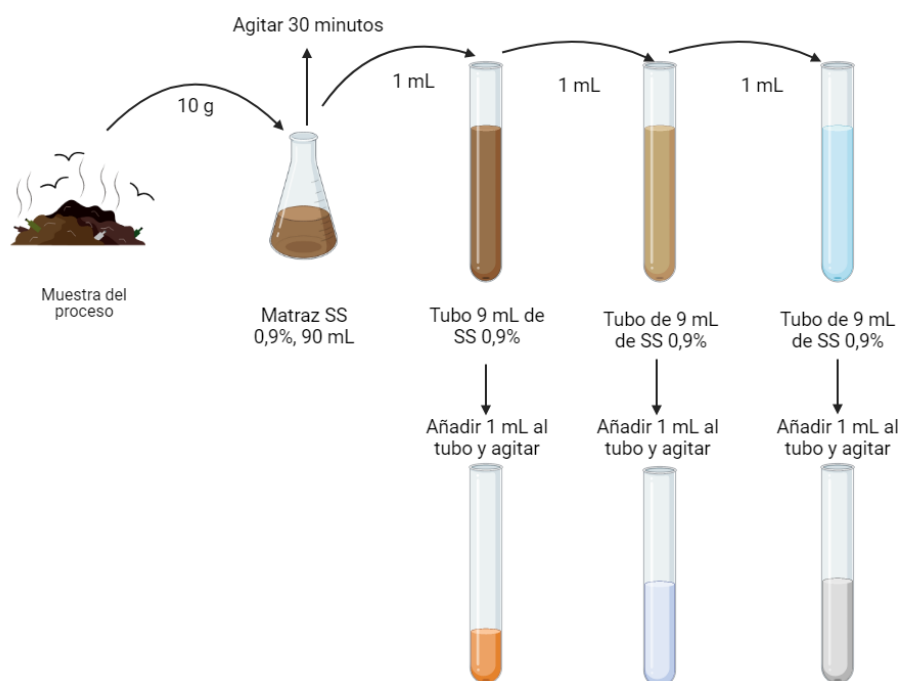
Para este grupo se usó el medio BURK. Para ello, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L y se añadieron unas esferas de cristal de sílice, para repartir. Se dejaron las placas incubar durante 48 horas, a 30 °C. Posteriormente se realizó un recuento de las colonias visibles, contando cada una como una unidad formadora de colonias.

### 3.3.3. Solubilizadores de fosfatos y potasio

Para estos grupos se usan los medios detallados en las Tablas 3.6 y 3.7. Para ello, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, que se vertió sobre el medio sólido. Se añadieron unas esferas de cristal de sílice, para repartir. Se dejaron las placas incubar durante una semana, a 30 °C. Posteriormente se realizó un recuento de las colonias, siendo estas positivas si se apreciaba una pérdida de color o halo de transparencia alrededor de esta, contando cada una como una unidad formadora de colonias.

### 3.3.4. Sideróforos

En este medio se preparó la siembra de productores de sideróforos. Para ello, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, que se vertió sobre el medio sólido. Se añadieron unas esferas de cristal de sílice, para repartir. Se dejaron las placas incubar durante 72-96 horas, a 30 °C. Posteriormente se realizó un recuento de las colonias visibles, siendo estas positivas si se apreciaba un halo de color amarillo-rosáceo alrededor de la colonia, contando cada una como una unidad formadora de colonias.



**Figura 3.5.-** Método de dilución y siembra de tubos.

### 3.3.5. Nitrificantes

En este medio (Tabla 3.9) se dispuso la siembra de organismos nitrificantes. Para ello se tomó una alícuota de 1 mL, que se añadió sistemáticamente a 3 tubos por dilución usada. Posteriormente se dejó incubar a 30 °C durante 14 días. Para su lectura, se añade sobre el tubo 1 mL del reactivo 1 de nitrificantes. Tras esto, se añaden 12 gotas del reactivo 2. La prueba será positiva en presencia de nitrificantes si aparece un color azul al añadir este reactivo.

### 3.3.6. Amonificantes

En este medio, mostrado en la Tabla 3.10, se preparó la siembra tomando una alícuota de 1 mL, que se añadió sistemáticamente a 3 tubos por dilución usada. Posteriormente se dejó incubar a 30 °C durante 14 días. Para su lectura, se tomó 1 mL del medio y se transfirió a un tubo de hemólisis. Sobre este tubo se añaden 0,5 mL de cada uno de los reactivos de Nessler. La lectura del tubo será positiva en caso de aparecer coloración anaranjada. En caso de coloración amarillenta, se presupondrá negativo.

### 3.3.7. Desnitrificantes

En este medio (Tabla 3.11) se preparó la siembra de organismos desnitrificantes. Para ello se tomó una alícuota de 1 mL, que se añadió sistemáticamente a 3 tubos por dilución usada. Sobre estos tubos se crea un tapón mediante la adición de 1 mL de parafina, que crea las condiciones de anaerobiosis necesarias. Posteriormente se dejó incubar a 30 °C durante 14 días. Para su lectura, se observa el color del medio. En caso de permanecer naranja o rojizo, es un tubo positivo. En caso de que sea amarillo claro o presente una pérdida de color, es un tubo negativo.

### 3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se usó el paquete informático Statgraphics 18 para Windows, de Statistical Graphics Co. Para la determinación del efecto de los distintos valores se realizó un análisis de la varianza (ANOVA múltiple) considerando las interacciones entre los factores. En cada caso para el cálculo de la suma de cuadrados (medida de la variación de cada factor) se utilizó el método de medida de tipo III y un nivel de significación del 0,5% en ANOVA. Una vez identificados los factores que influyen significativamente en los resultados, se aplicó un análisis de rangos múltiples mediante el método de las mínimas diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95%. Tras esto, se calcularon las correlaciones de Spearman entre los diferentes parámetros estudiados y se realizó un análisis de regresión múltiple con selección escalonada de variables. Además, se llevó a cabo, un análisis discriminante lineal de los parámetros muestra y muestreo para observar un patrón de comportamiento entre el proceso de compostaje efectuado.

## 4. Resultados

### 4.1. Parámetros de control

El proceso de compostaje puede llevarse a cabo con una enorme variedad de residuos orgánicos (Bian et al., 2019; Moreno et al., 2013; Olivera et al., 2017). Incluso con aquellos biomateriales que presentan una alta recalcitrancia (Tran et al., 2021). Pese a ello, la literatura científica no cuenta con una amplia experiencia en el compostaje de algas (Han et al., 2014). Por lo tanto, el presente trabajo constituye una interesante fuente de datos para el compostaje de algas. En primer lugar, para comprobar que el proceso de compostaje se estaba llevando a cabo de manera correcta, se llevó a cabo el análisis de diversos parámetros de control. El parámetro más importante de todo proceso de compostaje es la temperatura (Figura 4.1.).

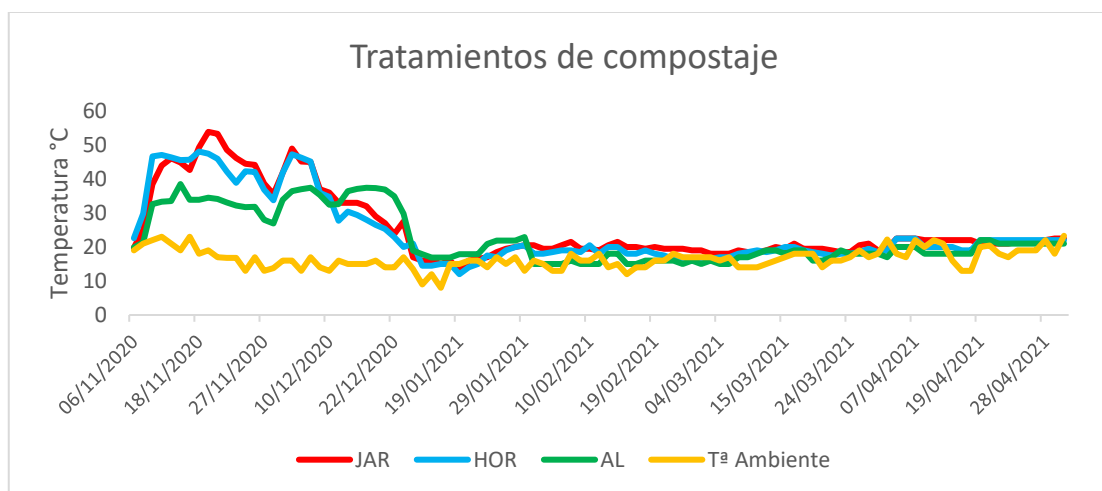


Figura 4.1.- Evolución de la temperatura en el proceso

En ella, se observa la evolución de la temperatura durante el proceso de compostaje en las tres pilas constituidas. La pila de AL (alga en exclusividad) no alcanzó un aumento de temperatura que le permitiera alcanzar una fase termófila. Este hecho era de esperar, ya que las características intrínsecas del alga, no la capacitan para ser un residuo compostable por sí mismo. La baja relación C/N, la ausencia de fuentes carbonadas fácilmente asimilables por la microbiota y la alta presencia en sales son, principalmente, las responsables de este problema (Han et al., 2014). Pese a esto, multitud de residuos orgánicos con estas características comunes, son plenamente compostables en conjunción con agentes acondicionadores que suplan los defectos que presentan (Gutiérrez et al., 2017). Por otro lado, la pila HOR (66% restos hortícolas y 33% alga) y la pila JAR (66% restos de poda de jardinería y 33% alga) alcanzaron condiciones termófilas, distando aún de la temperatura ideal en fase termófila (65-70 °C, Liu et al., 2018) para asegurar una correcta higiene de la pila. En realidad, dadas las particularidades tanto de los residuos acondicionadores usados, el tamaño de la pila y el tamaño de partícula del alga recalcitrante, el comportamiento de la temperatura es perfectamente justificable. La microbiota responsable de biotransformar el material encontró un freno considerable en la escasa presencia de carbono asimilable. Este comportamiento, es detectado con frecuencia en plantas de compostaje que se enfrentan al reto de compostar residuos con alto contenido en nitrógeno (Zhu et al., 2019). Pese a que la temperatura es la principal herramienta de seguimiento del proceso, es habitual el empleo de otros parámetros físico-químicos para un seguimiento correcto del proceso. Para ello, en la Tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos para materia orgánica, humedad y pH que presentaba cada pila en el momento del muestreo.

|     | MPR  |       |      | TER  |       |      | ENF  |       |      | PRF  |       |      |
|-----|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|
|     | % MO | % HUM | pH   | % MO | % HUM | pH   | % MO | % HUM | pH   | % MO | % HUM | pH   |
| JAR | 77,3 | 29    | 6,85 | 70,3 | 51    | 7,58 | 71,0 | 66    | 7,58 | 66,5 | 42    | 8,08 |
| AL  | 80,5 | 31    | 7,95 | 70,8 | 53    | 7,67 | 77,4 | 68    | 7,06 | 73,2 | 46    | 7,60 |
| HOR | 76,0 | 37    | 7,27 | 66,8 | 58    | 7,86 | 69,9 | 68    | 7,71 | 68,0 | 31    | 7,40 |

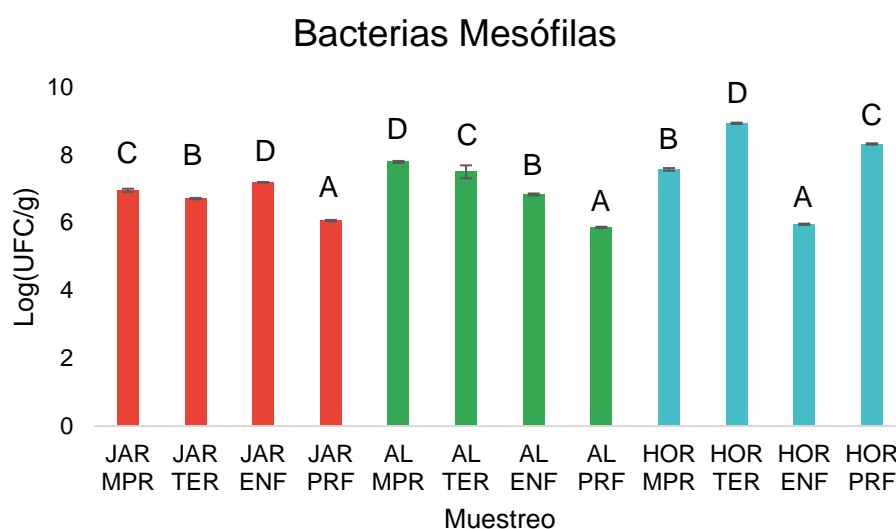
**Tabla 4.1.-** Contenido en materia orgánica, humedad y pH a lo largo del proceso en las pilas de compostaje. MO: materia orgánica, HUM: humedad.

El porcentaje de materia orgánica presente en las pilas se redujo a lo largo del proceso como consecuencia de la acción degradadora de los microorganismos, bajando de forma más intensa en la pila de JAR (10,8%), y a un nivel menor en AL y HOR (6,8 y 8% respectivamente). Estos resultados concuerdan con los resultados mostrados por Cáceres et al. (2016), pero reflejan una escasa mineralización de la materia orgánica en comparación con procesos de compostaje más tradicionales, donde la fase termófila se alcanza de forma más intensa (Onwosi et al., 2017). Al inicio del proceso, el porcentaje de humedad razonable en procesos de este tipo oscila entre el 40 y el 60%, aunque preferiblemente se trabaja en rangos del 50-60% (Estrella-González, 2020). En todos los casos, tanto en la etapa termófila como en la de enfriamiento se observó un incremento de la misma siendo en el producto final cuando se obtuvieron valor de humedad

cercanas a lo estipulado en legislación. Según el BOE 999/2017, el producto final de un proceso de compostaje debe tener un porcentaje de humedad inferior a 40. En base a esta premisa, la única pila de compostaje que mostró un valor conforme a la legislación fue la correspondiente a la mezcla del alga y restos hortícolas (HOR). Aun así, lo que se buscó durante el experimento fue mantener un contenido de humedad adecuado en las pilas que no comprometiera la supervivencia microbiana. La evolución del pH está íntimamente relacionada con la composición de las pilas y, por ende, con la biodegradación de la materia orgánica. En base a esto, se observó que en el caso de JAR el pH se volvió básico al final del proceso mientras que en el caso de la pila HOR mostró un ligero incremento y en la pila de AL se produjo una ligera acidificación del producto final. Estos resultados concuerdan con los observado por otros autores (López-González et al., 2013; Tian et al., 2013) y no suponen un problema a la actuación de la microbiota del proceso de compostaje

## 4.2. Bacterias Mesófilas

En la Figura 4.2. se muestran los valores obtenidos para las bacterias mesófilas durante el proceso. Para un análisis más profundo, se realizaron análisis estadísticos: análisis de la varianza (Tabla 4.2.) y de múltiple comparación para los valores en distintas pilas (Tabla 4.3.).



**Figura 4.2.** Cuantificación de los niveles de bacterias mesófilas en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|--------|--------|
| A:Muestra    | 5,93787           | 2  | 2,96893             | 758,92 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 7,21839           | 3  | 2,40613             | 615,06 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,00171667        | 2  | 0,000858333         | 0,22   | 0,8061 |
| Residual     | 0,0469444         | 12 | 0,00391204          |        |        |
| Total        | 29,6731           | 35 |                     |        |        |

**Tabla 4.2.** Análisis de varianza para los valores de bacterias mesófilas obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

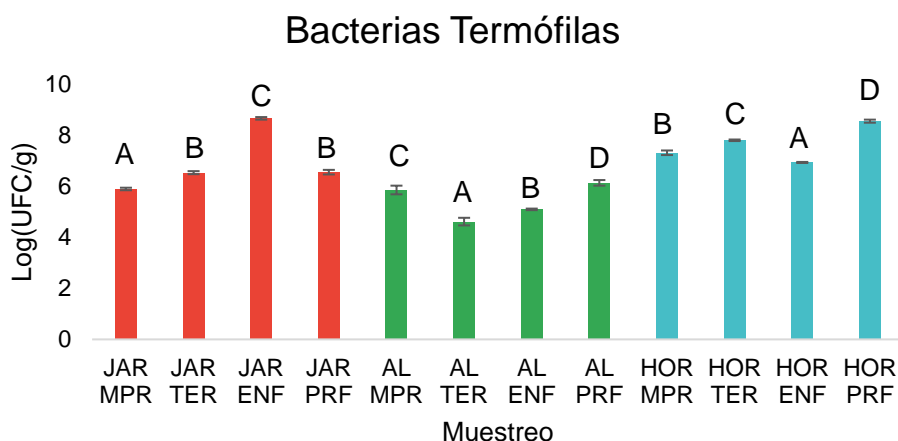
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 6,73              | A               |
| AL      | 6,99              | B               |
| HOR     | 7,69              | C               |

**Tabla 4.3.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias mesófilas en las distintas pilas

En la Tabla 4.2., se muestran diferencias significativas en la muestra y el muestreo, pero no así entre repeticiones, por lo que las repeticiones no afectaron al resultado. El análisis de grupos homogéneos de la Tabla 4.3. muestra que cada pila forma un grupo de homogeneidad distinto, es decir, que cada pila ha sufrido un desarrollo distinto que afecta al contenido de bacterias mesófilas. Se puede observar cómo tanto en el caso de JAR y AL se obtuvieron valores inferiores a los iniciales. En el caso de la pila HOR los valores fueron ligeramente superiores, siendo la etapa termófila de esta misma pila en la que se realizó el recuento más elevado, siendo este perfil similar la obtenido por Vargas-García et al. (2010). Los valores de JAR y AL muestran una clara tendencia a la baja de estos microorganismos, lo cual muestra una estabilización y un agotamiento de los nutrientes presentes en las pilas (Liu et al., 2018). Por otra parte, en la pila de HOR se detectó un brusco descenso en la fase de enfriamiento, lo cual puede indicar una falta de carbono biodisponible que permitiera del desarrollo de bacterias termotolerantes.

### 4.3 Bacterias Termófilas

En la Figura 4.3. se representan los valores correspondientes al grupo microbiano de bacterias termófilas. Igualmente, se analizó la varianza (Tabla 4.4) y un test de múltiple comparación (Tabla 4.5).



**Figura 4.3.-** Cuantificación de los niveles de bacterias termófilas en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Barra error: Error Estándar.

Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F       | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|---------|--------|
| A:Muestra    | 30,9822           | 2  | 15,4911             | 2295,29 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 3,99943           | 3  | 1,33314             | 197,53  | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,0236222         | 2  | 0,0118111           | 1,75    | 0,2153 |
| Residual     | 0,0809889         | 12 | 0,00674907          |         |        |
| Total        | 53,0338           | 35 |                     |         |        |

**Tabla 4.4.-** Análisis de varianza para los valores de bacterias termófilas obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 6,92              | B               |
| AL      | 5,43              | A               |
| HOR     | 7,66              | C               |

**Tabla 4.5.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en bacterias termófilas en las distintas pilas

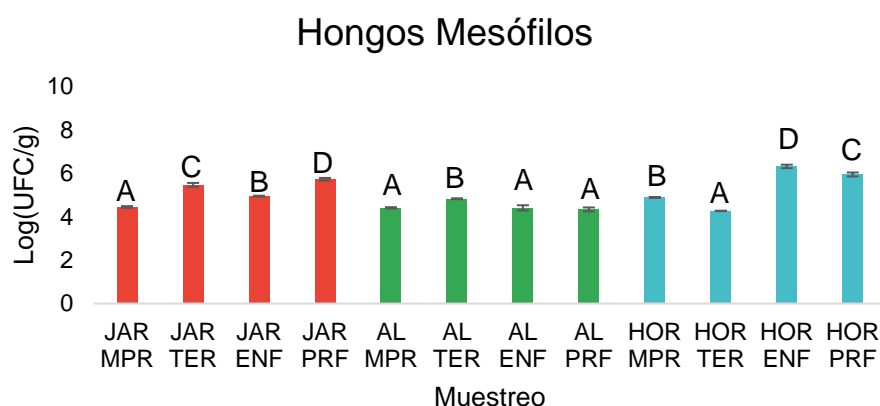
En la Tabla 4.4., los valores obtenidos en el análisis de la varianza. Se pueden observar las diferencias significativas en la muestra y el muestreo, pero no así entre las repeticiones. El análisis de grupos homogéneos de la Tabla 4.5. mostró que cada pila forma un grupo de homogeneidad distinto, es decir, que cada pila construida desarrolló una evolución distinta de bacterias termófilas. Los valores más elevados, de manera global, se observaron en la pila correspondiente a la pila de HOR. A pesar de esto, el valor más elevado se dio en la etapa ENF de JAR. Esto apunta a la existencia de un alto número de bacterias termotolerantes, capaces de sobrevivir en las condiciones mesófilas y termófilas de la pila (Moreno et al., 2021). En cambio,



el escaso contenido en termófilos de la pila constituida plenamente por el alga es reflejo de la escasa actividad microbiana que contuvo, debido a que, en realidad, esta pila no sufrió un proceso de compostaje realmente.

#### 4.4 Hongos Mesófilos

Como era de esperar, los valores de hongos mesófilos (Figura 4.4.) fueron inferiores a los valores de Bacterias Mesófilas. Para comprobar cuan significativos son los diferentes factores de estudio, se realizó un análisis de varianza (Tabla 4.6.) y otro de múltiple comparación para los valores entre pilas (Tabla 4.7.).



**Figura 4.4.-** Cuantificación de los niveles de hongos mesófilos en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Barra error: Error Estándar. Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|--------|--------|
| A:Muestra    | 4,82357           | 2  | 2,41179             | 510,58 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 3,24174           | 3  | 1,08058             | 228,76 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,00587222        | 2  | 0,00293611          | 0,62   | 0,5535 |
| Residual     | 0,0566833         | 12 | 0,00472361          |        |        |
| Total        | 16,3618           | 35 |                     |        |        |

**Tabla 4.6.-** Análisis de varianza para los valores de hongos mesófilos obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

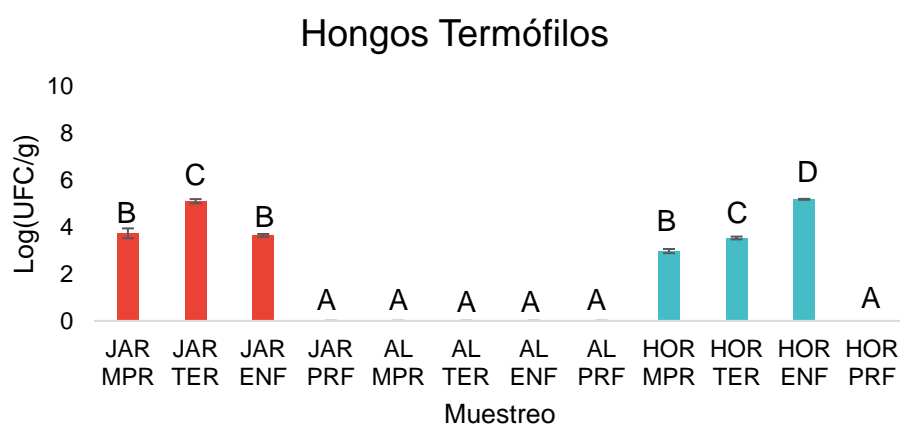
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 5,15              | B               |
| AL      | 4,50              | A               |
| HOR     | 5,375             | C               |

**Tabla 4.7.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en hongos mesófilos en las distintas pilas

De nuevo, el resultado del análisis estadístico revela un patrón de diferencia estadística en función de la pila y el punto de muestreo. Los hongos son claramente más termosensibles que las bacterias durante el compostaje, por lo que, es un grupo particularmente adecuado para la caracterización del proceso (López-González et al., 2015b). En el presente caso, debido a la débil fase termófila alcanzada, los resultados no muestran un fuerte descenso según lo esperado en la fase termófila. Lo cual, no debe achacarse solo al desarrollo del proceso, ya que en este grupo existe una cierta plasticidad térmica (Moreno et al., 2021). Los valores más elevados en el producto final se obtuvieron en la pila de HOR. Pero todos los valores de las pilas JAR y AL son muy similares, lo que nos indica que no existió una gran diferencia entre las fases, resultado que refuerza la presencia de una microbiota adaptada al proceso. En HOR muestran un ascenso en ENF y PRF, lo cual indica una cierta reactivación de la pila conforme desciende la temperatura (Duan et al., 2019).

#### 4.5 Hongos Termófilos

El patrón descrito por los hongos termófilos durante el compostaje desarrollado se muestra en la Figura 4.5. Para comprobar la significancia de los distintos factores de estudio, se realizó un análisis de varianza (Tabla 4.8) y otro de múltiple comparación para valores entre pilas (Tabla 4.9).



**Figura 4.5.-** Cuantificación de los niveles de hongos termófilos en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F       | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|---------|--------|
| A:Muestra    | 73,4774           | 2  | 36,7387             | 6754,82 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 51,591            | 3  | 17,197              | 3161,86 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,00695556        | 2  | 0,00347778          | 0,64    | 0,5447 |
| Residual     | 0,0652667         | 12 | 0,00543889          |         |        |
| Total        | 158,932           | 35 |                     |         |        |

**Tabla 4.8.-** Análisis de varianza para los valores de hongos termófilos obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

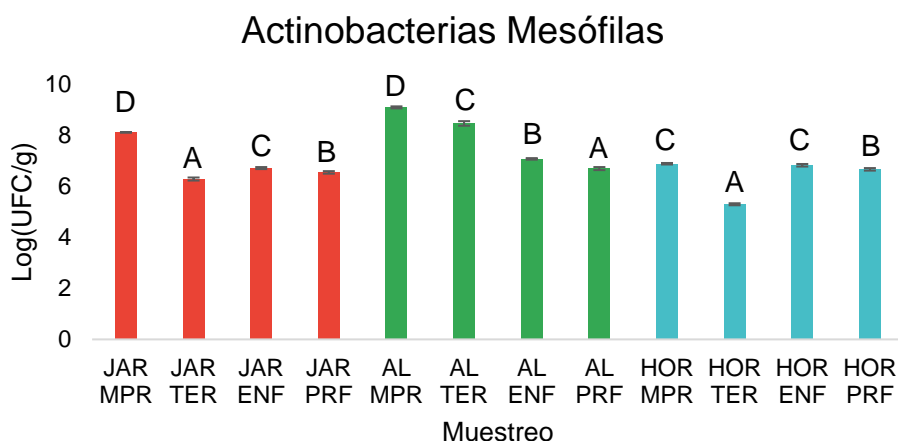
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 3,12              | C               |
| AL      | 0                 | A               |
| HOR     | 2,93              | B               |

**Tabla 4.9.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en hongos termófilos en las distintas pilas

Tal y como se observa en la Tabla 4.8, se determinaron diferencias significativas en muestra y muestreo, pero no en las repeticiones, lo cual se comprueba en el análisis de grupos homogéneos (Tabla 4.9). El valor más alto se encontró durante el enfriamiento de la pila HOR, lo cual indicó que los hongos presentes eran principalmente termotolerantes. Este patrón, en realidad es el esperado en compostaje (Moreno et al., 2021). De hecho, los resultados de este grupo refuerzan con mayor claridad lo que se apuntaba en mesófilos. Por ejemplo, este grupo fue inexistente en la pila de AL, lo cual es indicativo de su recalcitrancia e inadaptación al proceso de proceso de compostaje, comportamiento que solo puede ser corregido mediante co-compostaje. Tampoco se muestra la presencia de este grupo en el producto final en ninguna de las pilas, como previamente se había descrito en el artículo de Bhatia et al. (2011).

#### 4.6 Actinobacterias Mesófilas

Los resultados de actinobacterias mesófilas (Figura 4.6) se reflejan a continuación. Así mismo se realizaron dos análisis estadísticos: análisis de la varianza (Tabla 4.10.) y de múltiple comparación para los valores en distintas pilas (Tabla 4.11.).



**Figura 4.6.** -Cuantificación de los niveles de actinobacterias mesófilas en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Barra error: Error Estándar. Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F       | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|---------|--------|
| A:Muestra    | 12,3308           | 2  | 6,16539             | 2561,01 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 11,7061           | 3  | 3,90203             | 1620,84 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,0146722         | 2  | 0,00733611          | 3,05    | 0,0851 |
| Residual     | 0,0288889         | 12 | 0,00240741          |         |        |
| Total        | 35,1591           | 35 |                     |         |        |

**Tabla 4.10.** Análisis de varianza para los valores de actinobacterias mesófilas obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); **Se marcan en rojo los factores significativos**

| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 6,92              | B               |
| AL      | 7,84              | C               |
| HOR     | 6,42              | A               |

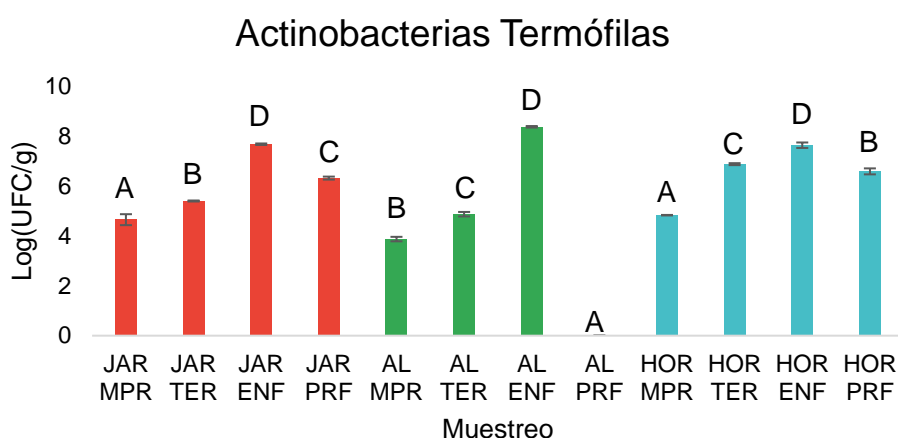
**Tabla 4.11.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en actinobacterias mesófilas en las distintas pilas

En la Tabla 4.10. se puede interpretar que existieron diferencias significativas entre la muestra y el muestreo, pero no así entre repeticiones. Por otra parte, la Tabla 4.11 muestra según los grupos de homogeneidad que cada pila presentó un contenido en actinobacterias mesófilas diferente estadísticamente del resto. Como era de esperar, de acuerdo a la bibliografía (López-González, 2015), los valores obtenidos fueron más elevados que los de Hongos Mesófilos, observando una bajada importante en número durante la fase TER y ENF. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Jurado et al. (2014) y de Gannes et al. (2013) en otros trabajos. El valor más elevado fue observado en AL en las materias primas. Este resultado pone de manifiesto que las actinobacterias constituyen una fuente importante de la microbiota indígena

del alga *R. okamurae*. Una vez comenzó el proceso, se produjo un descenso paulatino en la presencia de actinobacterias. Este hecho puede ser debido a que, con el acondicionamiento del material para el compostaje (humectación y volteos), se favorece la instauración de otros grupos microbianos que intervienen en compostaje, como los esporulados (Ma et al., 2018), desplazando la dominancia inicial de actinobacterias en la pila. Los valores finales de las 3 pilas son muy similares lo cual indica cierta estabilización y similitud entre las pilas para este parámetro, alcanzado una población de actinobacterias mesófilas superior a las 6 unidades logarítmicas por gramo de compost generado, dato muy similar al que se genera en el compostaje de residuos hortícolas tradicional (López-González et al., 2013)

#### 4.7 Actinobacterias Termófilas

Los valores del grupo de actinobacterias termófilas se reflejan en la Figura 4.7, y para comprobar cuan significativos son los diferentes factores de estudio, se ejecutó un análisis de varianza (Tabla 4.12) y otro de múltiple comparación para los valores entre pilas (Tabla 4.13).



**Figura 4.7.-** Cuantificación de los niveles de actinobacterias termófilas en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F       | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|---------|--------|
| A:Muestra    | 32,5145           | 2  | 16,2573             | 1822,96 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 74,8197           | 3  | 24,9399             | 2796,56 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,00406667        | 2  | 0,00203333          | 0,23    | 0,7995 |
| Residual     | 0,107017          | 12 | 0,00891806          |         |        |
| Total        | 167,812           | 35 |                     |         |        |

**Tabla 4.12.-** Análisis de varianza para los valores de actinobacterias termófilas obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

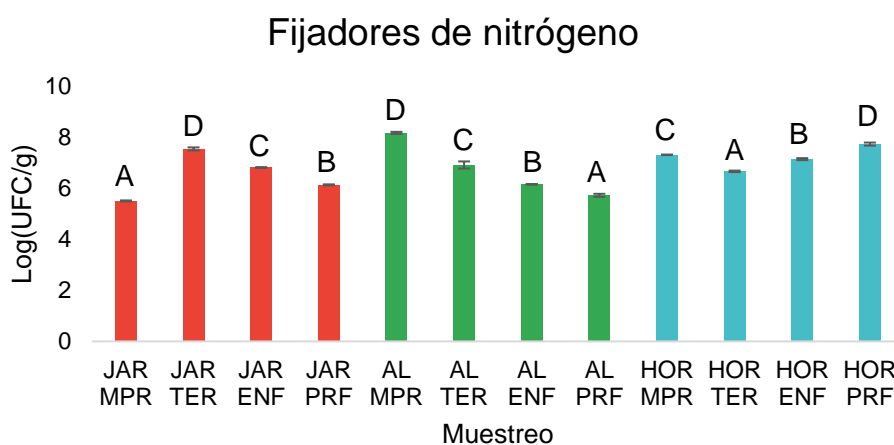
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 6,02              | B               |
| AL      | 4,29              | A               |
| HOR     | 6,50              | C               |

**Tabla 4.13.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en actinobacterias termófilas en las distintas pilas

Como se puede visualizar en la Tabla 4.12, se muestran diferencias significativas en la muestra y el muestreo. De hecho, se registró un importante incremento en número de actinobacterias termófilas una vez superada la fase termófila del proceso. Corroborando, por un lado, la alta termotolerancia asociada a este grupo microbiano (Moreno et al., 2021), así como, que es un grupo microbiano residente y responsable de gran parte de los cambios biotransformativos que suceden durante el proceso de compostaje (López-González et al., 2015; Wang et al., 2016). Los valores registrados en el presente trabajo son similares a los mostrados por Jurado et al. (2014) y de Gannes et al. (2013). La desaparición de actinobacterias termófilas en la pila de AL, pese a ser un dato relativamente particular, se justifica por el desplazamiento de esta comunidad adaptada al compostaje, por parte de otros grupos microbianos, ya que esta pila en realidad no sufrió un proceso de compostaje al uso.

#### 4.8 Fijadores de nitrógeno

Los resultados del grupo de fijadores de nitrógeno quedan reflejados y analizados estadísticamente en la Figura 4.8 y las Tablas 4.14. y 4.15.



**Figura 4.8.-** Cuantificación de los niveles de fijadores de nitrógeno en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|--------|--------|
| A:Muestra    | 3,15922           | 2  | 1,57961             | 510,47 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 1,56967           | 3  | 0,523222            | 169,08 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,000716667       | 2  | 0,000358333         | 0,12   | 0,8916 |
| Residual     | 0,0371333         | 12 | 0,00309444          |        |        |
| Total        | 22,1908           | 35 |                     |        |        |

**Tabla 4.14.-** Análisis de varianza para los valores de fijadores de nitrógeno obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); **Se marcan en rojo los factores significativos**

| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 6,50              | A               |
| AL      | 6,75              | B               |
| HOR     | 7,22              | C               |

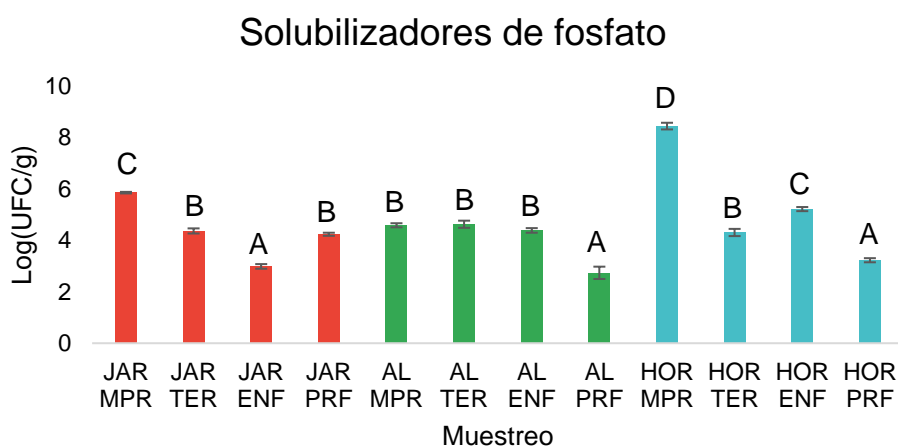
**Tabla 4.15.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en fijadores de nitrógeno en las distintas pilas

En la Tabla 4.14. se muestran diferencias significativas en la muestra y el muestreo, pero no así entre repeticiones, lo que refleja que este grupo microbiano evoluciona a lo largo del proceso de compostaje. El análisis de grupos homogéneos de la Tabla 4.15. muestra que cada pila forma un grupo de homogeneidad distinto, es decir, que cada pila ha sufrido un desarrollo distinto y existe homogeneidad en las repeticiones.

En realidad, el hecho de cada pila mostrara un comportamiento distinto, era algo esperado. De acuerdo a las particularidades del proceso de fijación de fijación, las bacterias que lo llevan a cabo requieren de una importante carga de energía (Yang et al., 2019). Por lo tanto, en función de la disponibilidad de nutrientes asimilables en la pila, este grupo podrá proliferar. Aun así, los niveles poblacionales de este grupo fundamental no bajaron en ningún momento de las 5 unidades logarítmicas constatando el papel indispensable de este grupo en ambientes como el compostaje (Maeda et al., 2011). Los resultados de este grupo microbiano fueron similares a los niveles registrados de bacterias mesófilas, lo cual indica que, la mayor parte de estos fijadores de nitrógeno son bacterias mesófilas o termotolerantes que, a fin de cuentas, constituyen un grupo importante del proceso de compostaje. Resulta particularmente interesante evaluar la evolución de grupos biofertilizantes como los fijadores de nitrógeno en residuos de algas, ya que, no existe bibliografía sobre compostaje de este alga o similares que permita comparar los valores aquí obtenidos.

## 4.9 Solubilizadores de Fosfatos

El recuento microbiano correspondiente a solubilizadores de fosfato se muestra en la Figura 4.9. Además, le precede a un análisis de varianza (Tabla 4.16.) y de múltiple comparación para los valores entre pilas (4.17.).



**Figura 4.9.-** Cuantificación de los niveles de solubilizadores de fosfatos en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F       | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|---------|--------|
| A:Muestra    | 9,75536           | 2  | 4,87768             | 775,03  | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 40,5443           | 3  | 13,5148             | 2147,41 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,0406889         | 2  | 0,0203444           | 3,23    | 0,0753 |
| Residual     | 0,0755222         | 12 | 0,00629352          |         |        |
| Total        | 75,3987           | 35 |                     |         |        |

**Tabla 4.16.-** Análisis de varianza para los valores de solubilizadores de fosfatos obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 4,37              | B               |
| AL      | 4,09              | A               |
| HOR     | 5,30              | C               |

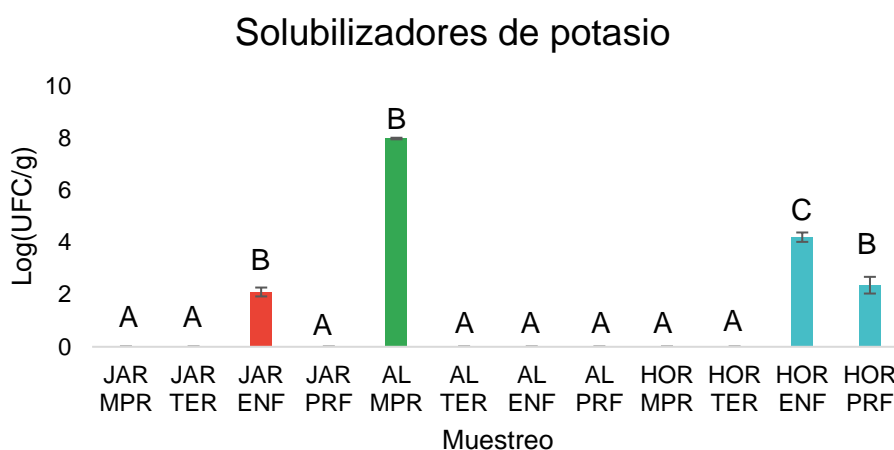
**Tabla 4.17.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en solubilizadores de fosfatos en las distintas pilas



Los resultados mostraron una presencia de agentes solubilizadores de fosfatos en todas las pilas y en todos los muestreos efectuados. Pese a lo anterior, como se puede distinguir en el estudio estadístico, se muestran diferencias significativas en la muestra y el muestreo. Este grupo está influenciado por la biodisponibilidad del fósforo, la cual depende en gran medida de las propiedades físico-químicas del suelo o compost (Bobadilla et al., 2008). En la Figura 4.9. se pueden comprobar los resultados obtenidos para este grupo microbiano, siendo el recuento más alto el de HOR en materias primas (superando incluso las 8 unidades logarítmicas). Esta dependencia de la biodisponibilidad explica la bajada en la pila HOR durante el proceso, al agotarse la fuente (se disminuye la cantidad no solubilizada). La presencia de este grupo en el compost final es un buen indicador de la buena capacidad biofertilizante que estos puedan tener. En general, estos resultados concuerdan con los reportados por Beltrán et al. (2005) y Fernández et al. (2005), y, por tanto, se puede intuir que la presencia de algas en compostaje no afecta de forma significativa a este grupo microbiano en el proceso.

#### 4.10 Solubilizadores de Potasio

En la Figura 4.10 se señalan los valores obtenidos para el grupo de solubilizadores de potasio. Para profundizar más allá, se realizaron varios análisis estadísticos para comprobar el grado de significación de cada uno de los factores empleados (Tablas 4.18. y 4.19.).



**Figura 4.10.-** Cuantificación de los niveles de solubilizadores de potasio en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|--------|--------|
| A:Muestra    | 14,1277           | 2  | 7,06386             | 475,67 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 39,7288           | 3  | 13,2429             | 891,75 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,0322167         | 2  | 0,0161083           | 1,08   | 0,3690 |
| Residual     | 0,178206          | 12 | 0,0148505           |        |        |
| Total        | 205,085           | 35 |                     |        |        |

**Tabla 4.18.-** Análisis de varianza para los valores de solubilizadores de potasio obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

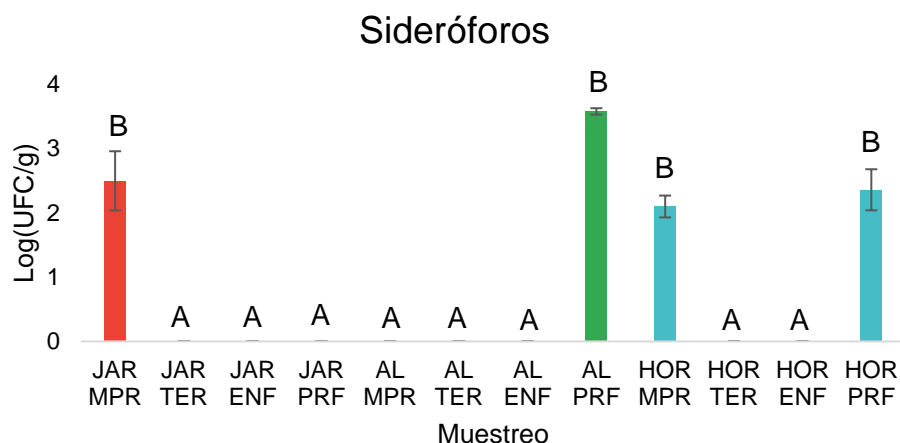
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 0,53              | A               |
| AL      | 2,00              | C               |
| HOR     | 1,64              | B               |

**Tabla 4.19.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en solubilizadores de potasio en las distintas pilas

De acuerdo a los resultados obtenidos y el estudio estadístico llevado a cabo, el comportamiento de los solubilizadores de potasio fue claramente mucho más intermitente en el proceso que los solubilizadores de fosfatos. En realidad, al igual que ocurre con el grupo microbiano del apartado anterior, la presencia de este grupo en el compost final es un buen indicador de la buena capacidad biofertilizante (Ahmad, 2016). Pero, al contrario de lo que ocurre con los solubilizadores de fosfato, que están presentes en todas las fases del proceso, los solubilizadores de potasio solo se detectaron en momentos determinados del proceso de compostaje. En la Figura 4.10. se puede observar que en la pila JAR se encontró una baja concentración de estos en la etapa de enfriamiento. En el caso de AL, el recuento de este grupo microbiano en MPR fue el más elevado de los tres procesos. En cambio, en el caso de HOR se pudo llevar a cabo recuento tanto en el caso de la etapa de enfriamiento como en el producto final, lo cual lo posiciona como el candidato idóneo para suelos con baja disponibilidad de potasio. Igualmente, no hay constancia del estudio de este grupo en el proceso de compostaje de macroalgas, por lo que no existe un perfil típico del grupo en el proceso. Eso resalta el posible valor fertilizante que pueden tener los productos generados en el trabajo, ya que está plenamente constatada la importancia de este grupo en compost de carácter biofertilizante (Sánchez et al., 2017).

#### 4.11 Agentes Sideróforos

Los valores reflejados en la Figura 4.11. y las Tablas 4.20 y 4.21 muestran el comportamiento de los agentes quelantes de hierro durante el estudio.



**Figura 4.11.-** Cuantificación de los niveles de sideróforos en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|--------|--------|
| A:Muestra    | 1,4456            | 2  | 0,7228              | 29,47  | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 28,6707           | 3  | 9,5569              | 389,68 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,02735           | 2  | 0,013675            | 0,56   | 0,5867 |
| Residual     | 0,2943            | 12 | 0,024525            |        |        |
| Total        | 60,0509           | 35 |                     |        |        |

**Tabla 4.20.-** Análisis de varianza para los valores de productores de sideróforos obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); **Se marcan en rojo los factores significativos**

| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 0,63              | A               |
| AL      | 0,90              | B               |
| HOR     | 1,12              | C               |

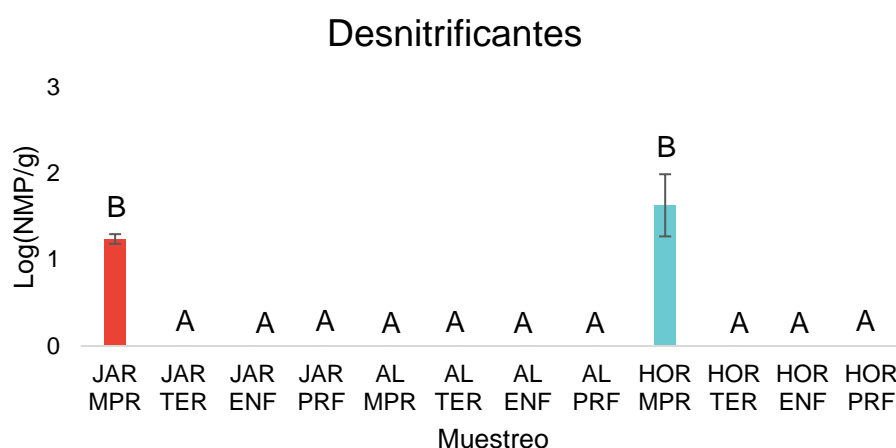
**Tabla 4.21.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en productores de sideróforos en las distintas pilas

La presencia de sideróforos en las pilas mostró un desarrollo ampliamente variable, lo cual muestra diferencias en la aireación y la limitación de hierro que han sufrido, según lo descrito por Gosh et al. (2020). La presencia de este grupo resulta altamente beneficiosa para los cultivos, es decir, para su uso como biofertilizante, mejorando la absorción de hierro por la planta y limitando su disponibilidad para patógenos (Hesse et al., 2017). Además, el valor más alto se registró asociado a compost finales. De hecho, tan solo se hallaron agentes quelantes de hierro o bien en las materias primas o bien en los productos finales, es decir, durante el compostaje no se registró la presencia del grupo La pila de JAR solo presenta este grupo en su fase inicial, lo cual indica que se agotó la fuente de hierro presente o este grupo no era termotolerante. La pila

de HOR los muestra al inicio y en PRF, lo cual indica una posible capacidad termorresistente para resistir los cambios de temperatura o una colonización por parte de nuevas bacterias capaces de soportar las nuevas condiciones.

## 4.12 Desnitrificantes

Los valores del grupo de desnitrificantes (Figura 4.12) muestran la presencia de este grupo microbiano durante el proceso de compostaje. Se ejecutó un análisis de varianza (Tabla 4.22) y otro de múltiple comparación para los valores entre pilas (Tabla 4.23).



**Figura 4.12.-** Cuantificación de los niveles de desnitrificantes en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|--------|--------|
| A:Muestra    | 1,08047           | 2  | 0,540233            | 44,59  | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 6,1347            | 3  | 2,0449              | 168,77 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,0180667         | 2  | 0,00903333          | 0,75   | 0,4952 |
| Residual     | 0,1454            | 12 | 0,0121167           |        |        |
| Total        | 10,7227           | 35 |                     |        |        |

**Tabla 4.22.-** Análisis de varianza para los valores de desnitrificantes obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

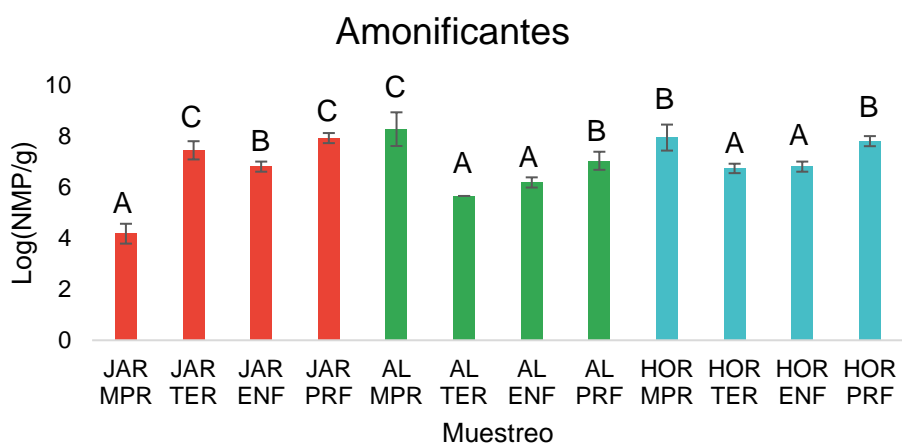
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 0,31              | B               |
| AL      | 0                 | A               |
| HOR     | 0,41              | C               |

**Tabla 4.23.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en desnitrificantes en las distintas pilas

La baja presencia de este grupo en compostaje resulta beneficiosa y muestra que se ha seguido un protocolo eficiente para el compostaje, al evitar los malos olores y pérdidas de nitrógeno en forma de  $N_2O$  según se describe en Sun et al. (2021). La presencia en materiales de partida indica que el grupo microbiano constituye parte de la microbiota indígena del material. Esto puede significar una mala aireación de los materiales de partida. Por tanto, los volteos fueron adecuados para evitar la proliferación de este grupo durante el proceso, evitando la pérdida de nitrógeno por emisión a la atmósfera.

#### 4.13 Amonificantes

Los resultados del grupo de amonificantes durante el compostaje se muestran en la Figura 4.13 las Tablas 4.24 y 4.25.



**Figura 4.13.-** Cuantificación de los niveles de amonificantes en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error.

| Parámetro    | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F     | P      |
|--------------|-------------------|----|---------------------|-------|--------|
| A:Muestra    | 3,46014           | 2  | 1,73007             | 28,99 | 0,0000 |
| B:Muestreo   | 5,9107            | 3  | 1,97023             | 33,01 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,399272          | 2  | 0,199636            | 3,35  | 0,0700 |
| Residual     | 0,71615           | 12 | 0,0596792           |       |        |
| Total        | 46,7237           | 35 |                     |       |        |

**Tabla 4.24.-** Análisis de varianza para los valores de amonificantes obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); Se marcan en rojo los factores significativos

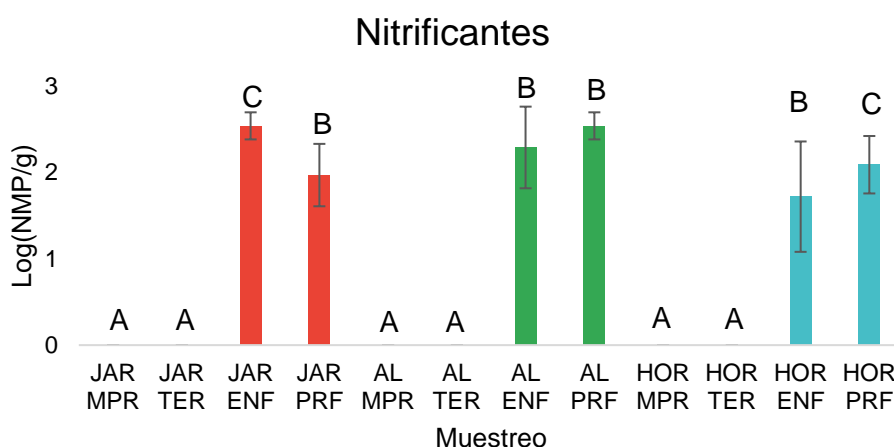
| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 6,59              | A               |
| AL      | 6,79              | A               |
| HOR     | 7,33              | B               |

**Tabla 4.25.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en amonificantes en las distintas pilas

Durante el proceso, las pilas de HOR y AL siguieron un patrón de desarrollo similar, en el que tras un número inicial en MPR alto sufrieron un descenso en termofilia, para, una vez bajada la temperatura volver a valores iniciales en PRF. Por otra parte, la pila JAR muestra un valor inicial bajo que crece hasta alcanzar unos valores relativamente estables durante el resto del proceso de compostaje. Esta similitud de los valores finales entre pilas es lo esperado según la literatura de ciclos del nitrógeno de Vargas-García et al. (2010). Los valores registrados en el proceso, si bien fueron esperados debido a la alta carga de nitrógeno orgánico que contenían los residuos, lo que realmente realzaron es la adecuación de los materiales para su uso como biofertilizante.

#### 4.14 Nitrificantes

Los valores reflejados en la Figura 4.14., son los del grupo de nitrificantes. Para un mejor análisis, se realizaron múltiples análisis estadísticos: análisis de la varianza (Tabla 4.26) y de múltiple comparación para los valores en distintas pilas (Tabla 4.27).



**Figura 4.14.-** Cuantificación de los niveles de nitrificantes en los procesos de compostaje obtenidos en el ensayo de compostaje. (n=3). Además, se muestra el análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para el factor muestra de compost, sobre las barras de error

| Parámetro         | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado de la suma | F      | P             |
|-------------------|-------------------|----|---------------------|--------|---------------|
| A:Muestra         | 0,409489          | 2  | 0,204744            | 3,26   | 0,0741        |
| <b>B:Muestreo</b> | 43,1446           | 3  | 14,3815             | 228,91 | <b>0,0000</b> |
| C:Repetición      | 0,160772          | 2  | 0,0803861           | 1,28   | 0,3135        |
| Residual          | 0,7539            | 12 | 0,062825            |        |               |
| Total             | 46,0005           | 35 |                     |        |               |

**Tabla 4.26.-** Análisis de varianza para los valores de nitrificantes obtenidos el proceso, y su correspondiente repetición por analítica<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GL: Grados de libertad; F: Valor Crítico de la distribución de Fisher; P: Probabilidad (Nivel de significación); **Se marcan en rojo los factores significativos**

| Muestra | Media Log (UFC/g) | Grupo homogéneo |
|---------|-------------------|-----------------|
| JAR     | 1,13              | AB              |
| AL      | 1,21              | B               |
| HOR     | 0,95              | A               |

**Tabla 4.27.-** Análisis de múltiple comparación (LSD 95%) para los valores obtenidos en nitrificantes en las distintas pilas

Como se puede observar en la Tabla 4.26, se detectaron tan solo diferencias significativas en el muestreo. Los valores fueron bastante similares entre pilas. Solo aparecieron en la fase de estabilización, es decir una vez concluida la fase bio-oxidativa, algo esperado según lo descrito por Vargas-García et al. (2010). La formación de formas nítricas del N durante el compostaje se asocia a madurez y estabilidad de los biomateriales (Siles-Castellano et al., 2020). La presencia de este grupo soluciona los posibles problemas de toxicidad del grupo de amonificantes, dan un valor importante como biofertilizante, pero también generan una forma de nitrógeno más fácil de perder por lixiviación. A tenor de los resultados obtenidos, este grupo no se vio afectado por la presencia del alga (y, por ende, su recalcitrancia).

#### 4.15 Tratamiento estadístico de datos

En la Figura 4.15 se muestra un análisis de correlación de Spearman para todos los grupos microbianos implicados, con una significancia del 95%.

|        | BM   | BT   | HM    | HT    | AM     | AT    | FN    | SP     | SK    | Sid.   | Nitri. | Desn.  | Amon. |
|--------|------|------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|
| BM     | 1,00 | 0,26 | -0,24 | -0,18 | 0,10   | 0,03  | 0,45* | 0,12   | 0,19  | -0,06  | -0,43* | 0,12   | 0,10  |
| BT     |      | 1,00 | 0,39* | 0,37* | -0,62* | 0,38* | 0,26  | -0,34* | 0,31  | 0,08   | 0,26   | -0,01  | 0,40* |
| HM     |      |      | 1,00  | 0,28  | -0,20  | 0,31  | 0,39* | 0,02   | 0,37* | -0,12  | 0,19   | -0,09  | 0,36* |
| HT     |      |      |       | 1,00  | -0,26  | 0,28  | 0,04  | 0,30   | 0,09  | -0,17  | -0,24  | 0,23   | -0,19 |
| AM     |      |      |       |       | 1,00   | -0,30 | 0,09  | 0,56*  | 0,25  | 0,04   | -0,21  | 0,30   | -0,27 |
| AT     |      |      |       |       |        | 1,00  | -0,02 | -0,19  | 0,15  | -0,52* | 0,38*  | -0,35* | -0,20 |
| FN     |      |      |       |       |        |       | 1,00  | 0,17   | 0,60* | -0,24  | -0,31  | -0,15  | 0,58* |
| SP     |      |      |       |       |        |       |       | 1,00   | -0,02 | -0,05  | -0,70* | 0,65*  | -0,12 |
| SK     |      |      |       |       |        |       |       |        | 1,00  | -0,19  | 0,16   | -0,31  | 0,32  |
| Sid.   |      |      |       |       |        |       |       |        |       | 1,00   | 0,14   | 0,52*  | 0,04  |
| Nitri. |      |      |       |       |        |       |       |        |       |        | 1,00   | -0,41* | 0,01  |
| Desn.  |      |      |       |       |        |       |       |        |       |        |        | 1,00   | -0,04 |
| Amon.  |      |      |       |       |        |       |       |        |       |        |        |        | 1,00  |

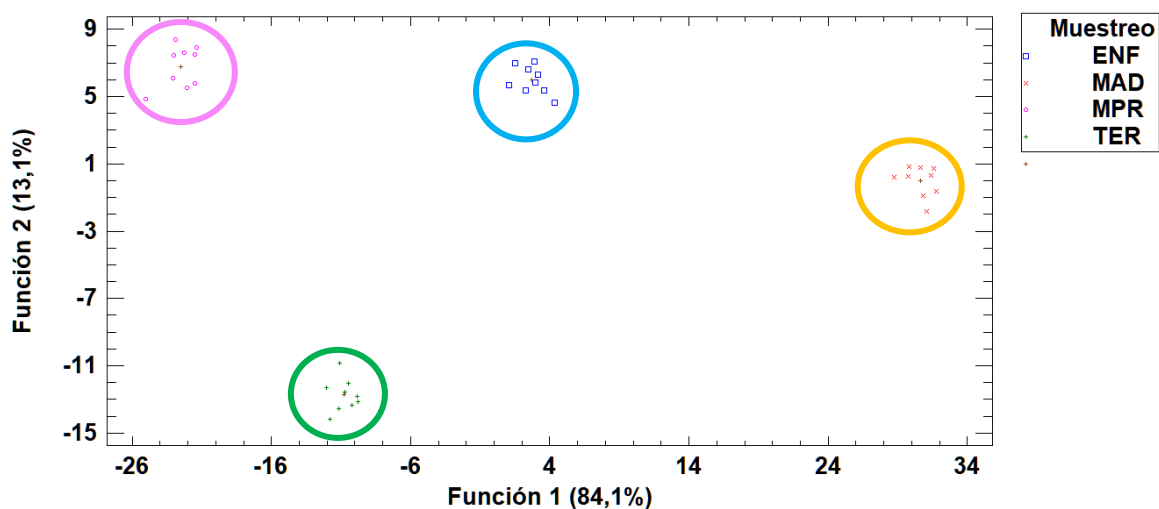
**Figura 4.15.-** Correlación ordinal de Spearman para LSD 95%. BM: bacterias mesófilas; BT: bacterias termófilas; HM: hogos mesófilos; HT: hongos termófilos; AM: actinobacterias mesófilas; AT: actinobacterias termófilas; FN: También se fijadores de nitrógeno; SP: solubilizadores de fosfatos; SK: solubilizadores de potasio; Sid.: productores de sideróforos; Nitri: nitrificantes; Desn: desnitrificantes; Amon: amonificantes. Los resultados significativos se marcan con \*.

En esta Figura, se puede apreciar una correlación negativa entre nitrificantes y desnitrificantes (-0,41), debido a que los grupos rastreados en el presente trabajo, el de nitrificantes y el de desnitrificantes anaerobios estrictos difícilmente pueden convivir en el mismo entorno, por lo que funcionan de manera opuesta entre sí (Pajares y Bohannon, 2020). En cambio, se produjo una alta correlación positiva entre fijadores de nitrógeno y los amonificantes (0,58), lo cual se debe a que la presencia de esos fijadores aumenta el nitrógeno disponible para las bacterias amonificantes. También se presentó una relación positiva (0,38) entre actinobacterias termófilas y las bacterias termófilas, como ocurre en López-González et al., (2013). Estos últimos valores son en pilas de compostaje de otros restos vegetales, al no existir abundante bibliografía sobre el compostaje de algas, y ninguno sobre compostaje de algas invasoras.



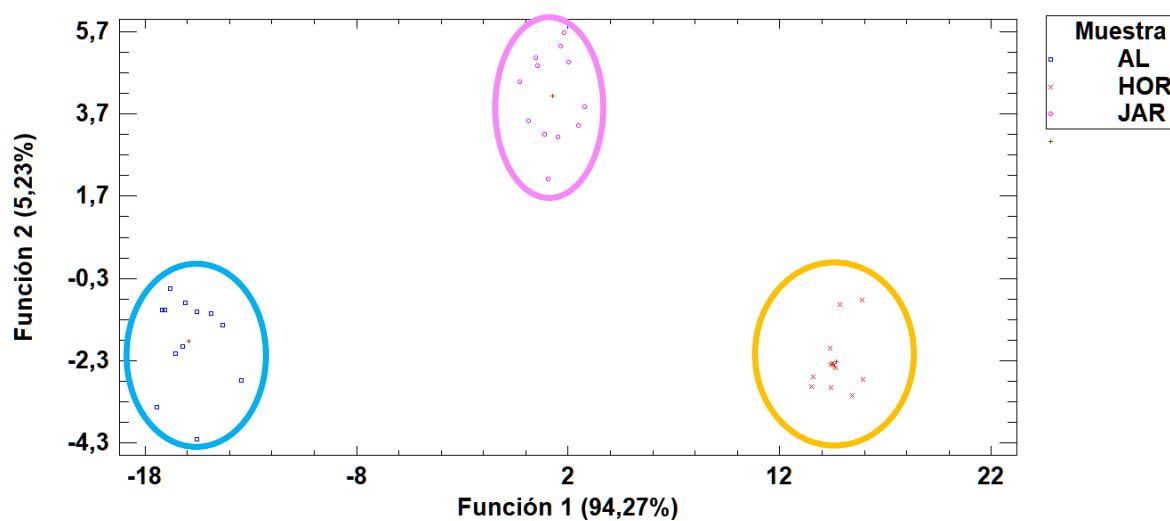
Además, se realizaron dos análisis discriminantes, mostrados en las Figuras 4.16 (para los muestreos) y 4.17 (para las pilas):

**Gráfica de Funciones Discriminantes**



**Figura 4.16.-** Estudio estadístico de los datos mediante funciones discriminantes para muestreo

**Gráfica de Funciones Discriminantes**



**Figura 4.17.-** Estudio estadístico de los datos mediante funciones discriminantes para muestra

El primero de ellos (Figura 4.16.) reveló dos funciones discriminantes responsables de más del 97,2%, pudiendo observar que los datos correspondientes a los diferentes grupos microbianos se agrupan por separado en base a la cada una de las etapas del proceso de compostaje, lo cual indica que existió una evolución distinta dependiente de la fase en la que se encontraba la pila, y por tanto de los parámetros de compostaje, en especial la temperatura. Esto es parecido a lo sucedido en Estrella et al. (2020 b). Para el segundo análisis (Figura 4.17.),

el análisis discriminante reveló dos funciones discriminantes responsables de más del 99,5% de la variabilidad observada entre los datos. A la vista de lo observado en esta figura, está claro que los datos relacionados con los diferentes grupos microbianos se agrupan por separado en base a las materias primas. Por tanto, las tres pilas forman un compost distinto, con propiedades agronómicas únicas. Por tanto, se puede conseguir un compuesto de interés agronómico a partir de este alga invasora y recalcitrante, creando así una opción para su eliminación y uso.

## 5. Conclusiones:

1. No todas las pilas han sufrido un proceso de compostaje completo, ya que el alga no ha alcanzado siquiera los 40 °C en ningún momento, por lo que, no es un residuo compostable por sí solo. Sin embargo, si se ha conseguido alcanzar un proceso de compostaje completo en las pilas de co-compostaje, demostrando la viabilidad de la creación de compost a partir, tanto de residuos hortícolas, como de restos de poda de jardinería; si bien, la baja relación C/N condiciona el proceso.
2. La pila conjunta de alga y restos hortícolas presenta una mayor capacidad biofertilizante respecto al resto debido a la gran presencia de solubilizadores de fosfatos, potasio, sideróforos y microorganismos beneficiosos implicados en el ciclo del nitrógeno.
3. El producto final es el más prometedor para su uso a gran escala, generando los mejores resultados desde el punto de vista agronómico, debido a la presencia de distintos grupos microbianos que permiten el uso sobre suelos pobres o con formas menos accesibles de fósforo, potasio o nitrógeno, así como de hierro.
4. La ausencia de desnitrificantes en el compostaje indica que no han existido grandes pérdidas de nitrógeno durante el proceso, reduciendo así la presencia de malos olores, evitando la aparición de insectos y plagas.
5. En el compost producido, existe un alto número de amonificantes y nitrificantes junto a fijadores de nitrógeno, lo cual indica la elevada importancia de la microbiota asociada al ciclo del nitrógeno; así como, la presencia de agentes solubilizadores de fósforo, potasio, y sideróforos en el producto final, lo cual realza sus capacidades biofertilizantes.

## 6. Bibliografía

- Ahmad M., Nadeem S.M., Naveed M., Zahir Z.A. 2016. Potassium-solubilizing bacteria and their application in agriculture. In: Meena VS, Maurya BR, Verma JP, Meena RS (eds) Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. Springer, India, 293-313.
- Ahmed, E., Holmström, S.J. M. 2014. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7(3), 196-208.
- Altamirano Jeschke, M., de la Rosa Álamos, J. 2020. Macroalgas invasoras en las costas andaluzas. *Eu Non-Native Species Risk Analysis*, Número Especial Boletín de la Sociedad Española de Ficología 55e.
- Baakza, A., Vala, A.K., Dave, B.P., Dube, H.C. 2004. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311(1), 1-9.
- Beltrán, S, Torrado, Y., Martínez, M., Matiz, A. 2005. Aislamiento de bacterias con capacidad fosfato solubilizadora a partir de suelos ácidos del norte de Boyacá y producción de un inóculo mixto en fermentación en discontinuo. Trabajo de fin de grado presentado como requisito para optar al título de microbiología industrial. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
- Beltrán Pineda, M.E. 2014. Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 15(1), 101-113.
- Bhatia, A., Ali, M., Sahoo, J., Madan, S., Pathania, R., Ahmed, N., Kazmi, A.A. 2011. Microbial diversity during Rotary Drum and Windrow Pile composting. *Journal of Basic Microbiology* 52, 5-15.
- Bian, B., Hu, X., Zhang, S., Lv, C., Yang, Z., Yang, W. Zhang, L. 2019. Pilot-scale composting of typical multiple agricultural wastes: Parameter optimization and mechanisms. *Bioresource Technology* 287, 123482.
- Bobadilla Henao, C., Rincón Vanegas, S.C. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Trabajo de fin de grado presentado como requisito para optar al título de microbiología industrial. Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
- Bonito, G., Isikhuemhen, O. S., Vilgalys, R. 2010. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresource Technology* 101(3), 1021-1027.
- Cáceres, R., Coromina, N., Malińska, K., Martínez-Farré, F.X., López, M., Soliva, M., Marfà, O. 2016. Nitrification during extended co-composting of extreme mixtures of green waste and solid fraction of cattle slurry to obtain growing media. *Waste Management* 58, 118-125.
- Consejería de Agricultura Ganadería Pesca y Desarrollo Sostenible. 2018. La complicada gestión de las especies exóticas marinas Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio

- Junta de Andalucía. Boletín de Gestión del Medio Natural y Espacios Protegidos No8. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.30d4b35a97db5c61716f2b105510e1ca/?vgnextoid=e60f12c02bd91610VgnVCM1000001325e50aRCD&vgnnextchannel=f2f26f21d7a61610VgnVCM2000000624e50aRCD&vgnnextfmt=portalwebSinMenu> Visitado el 13 de febrero de 2021
- de Gannes, V., Eudoxie, G., Hickey, W. 2013. Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. *Bioresource Technology* 133, 573-580.
- de Guardia, A., Mallard, P., Teglia, C., Marin, A., Le Pape, C., Launay, M., Benoist, J. C., Petiot, C. 2010. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: Part 2, nitrogen dynamic. *Waste Management* 30(3), 415-425.
- Duan, Y., Awasthi, S.K., Liu, T., Chen, H., Zhang, Z., Wang, q., Ren, X., Tu, Z., Awasthi, M.K., Taherzadeh, M.J. 2019. Dynamics of fungal diversity and interactions with environmental elements in response to wheat straw biochar amended poultry manure composting. *Bioresource Technology* 274, 410-417.
- Estrella-González, M.J. 2020. Estudio comparativo del proceso de compostaje a escala industrial: análisis metagenómico y vinculación con los parámetros críticos de control del proceso. Tesis Doctoral. Universidad de Almería
- Estrella-González, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., López, M.J., López-González, J.A., Siles-Castellano, A.B., Muñoz-Mérida, A., Moreno, J. 2020. Uncovering new indicators to predict stability, maturity and biodiversity of compost on an industrial scale. *Bioresource Technology* 313, 123557.
- Fernández, L.A., Zalba, P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del suelo* 23(1), 31-37.
- Figueras Huerta, A. 2020. *Rugulopteryx okamurae*: el alga asiática que infesta el Estrecho. Boletín medioambiente y energía. <https://theconversation.com/rugulopterix-okamurae-el-alga-asiatica-que-infesta-el-estrecho-130911> Visitado el 9 de febrero de 2021.
- García-Gómez, J. 2018. *Rugulopteryx okamurae*, alga exótica “explosiva” en el estrecho de Gibraltar. Observaciones preliminares de su distribución e impacto. Almoraima. *Revista de Estudios Campogibaltareño* 49, 97-113.
- Ghosh, S.K., Bera, T., Chakrabarty, A. M. 2020. Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences. *Biological Control* 144, 104-214.
- Gutiérrez, M.C., Siles, J.A., Diz, J., Chica, A.F., Martín, M.A. 2017. Modelling of composting process of different organic waste at pilot scale: Biodegradability and odor emissions. *Waste Management* 59, 48-58.
- Han, W., Clarke, W., Pratt, S. 2014. Composting of waste algae: A review. *Waste Management* 34(7), 1148-1155.

- Hesse, E., O'Brien, S., Tromas, N., Bayer, F., Luján, A.M., Van Veen, E.M., Hodgson, D.J., Buckling, A. 2018. Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. *Ecology Letters* 21, 117-127.
- Jurado, M., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Moreno, J. 2014. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology* 162, 283-293.
- Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., Moreno, J. 2015. Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 186, 15-24.
- Kumar, M., Ou, Y.L., Lin, J.G. 2010. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. *Waste Management* 30(4), 602-609.
- Lenntech. Ciclo del nitrógeno. <https://www.lenntech.es/ciclo-nitrogeno.htm> Visitado el 13 de mayo de 2021
- Liu, L., Wang, S., Guo, W., Zhao, T., Zhang, B. 2018. Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. *Waste Management* 73, 101-112.
- López-González, J.A., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suarez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J. 2013. Tracking organic matter and microbiota dynamics during the stages of lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology* 146, 574-584.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M. M., Moreno, J. 2015. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology* 175, 406-416.
- López-González, J.A., Vargas-García, M.C., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Moreno, J. 2015 b. Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology* 187, 305-313.
- Ma, S., Fang, C., Sun, X., Han, L., He, X., Huang, G. 2018. Bacterial community succession during pig manure and wheat straw aerobic composting covered with a semi-permeable membrane under slight positive pressure. *Bioresource Technology* 259, 221-227.
- Maćik, M., Gryta, A., Frąc, M. 2020. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy* 162, 31-87.
- Maeda, k., Hanajima, D., Toyoda, S., Yoshida, N., Morioka, R., Osada, T. 2011. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost. *Microbial Biotechnology* 4(6), 700-709.
- Maps, G. 2021. Mapa Andalucía y costa marroquí. <https://mapstyle.withgoogle.com/> Visitado el 9 de febrero de 2021.

- Montoya, S., Ospina, D., Sánchez, J. 2020. Evaluation of the Physical-Chemical and Microbiological Characteristics of the Phospho-Compost Produced Under Forced Aeration. System at the Industrial Scale. *Waste and Biomass Valorization* 11, 5977-5990.
- Moreno, J., Mormeneo, S. 2011. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J. y Moral, R. *Compostaje*. Mundi-prensa, Madrid, 111-140.
- Moreno, J., López, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., 2013. Recent advances in microbial aspect of compost production and use. *Acta Horticulturae (ISHS)* 1013, 443-457.
- Moreno, J., López-González, J.A., Arcos-Nievas, M.A., Suárez-Estrella, F., Jurado, M.M., Estrella-González, M.J., López, M. J. 2021. Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: A matter of thermotolerance. *Science of The Total Environment* 773, 145587.
- Navarro-Barranco, C., Muñoz-Gómez, B., Saiz, D., Ros, M., Guerra-García, J. M., Altamirano, M., Ostalé-Valriberas, E., Moreira, J. 2019. Can invasive habitat-forming species play the same role as native ones? The case of the exotic marine macroalga *Rugulopteryx okamurae* in the Strait of Gibraltar. *Biological Invasions* 21(11), 3319-3334.
- Negi, Y. K., Sajwan, P., Uniyal, S., Mishra, A. C. 2021. Enhancement in yield and nutritive qualities of strawberry fruits by the application of organic manures and biofertilizers. *Scientia Horticulturae* 283, 110038.
- Ninomiya, M., Hirohara, H., Onishi, J.I., Kusumi, T. 1999. Chemical study and absolute configuration of a new marine secospatane from the brown alga *Dilophus okamurae*. *Journal of Organic Chemistry* 64(15), 5436-5440.
- Oliveira, L.S.B.L., Oliveira, D.S.B.L., Bezerra, B.S., Pereira, B.S., Battistelle, R.A.G. 2017. Environmental analysis of organic waste treatment focusing on composting scenarios. *Journal of Cleaner Production* 155, 229-237.
- Onwosi, C.O., Igbokwe, V.C., Odimba, J.N., Eke, I.E., Nwankwoala, M.O., Iroh, I.N., Ezeogu, L.I. 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *Journal of Environmental Management* 190, 140-157.
- Pajares, S., Bohannan, B.J.M. 2016. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Frontiers in Microbiology* 7, 1045.
- Qiao, C., Ryan Penton, C., Liu, C., Shen, Z., Ou, Y., Liu, Z., Xu, X., Li, R., Shen, Q. 2019. Key extracellular enzymes triggered high-efficiency composting associated with bacterial community succession. *Bioresource Technology* 288, 121-576.
- Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes.
- Román-Muñoz, A., Martín-Taboada, A., De la Rosa, J., Carmona, R., Marianela, Z., Altamirano, M. 2019. La modelación de la distribución de especies como herramienta en la gestión de

invasiones biológicas en el medio marino: el caso de *Rugulopteryx okamurae* (Dictyotaceae, Ochrophyta) en el Mediterráneo. *Algas Boletín informativo editado por la Sociedad Española de Ficología (SEF)* 55(December), 37-40.

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

Siles-Castellano, A.B., López, M.J., Jurado, M.M., Suárez-Estrella, F., López-González, J.A., Estrella-González, M.J., Moreno, J. 2020. Industrial composting of low carbon/nitrogen ratio mixtures of agri-food waste and impact on compost quality. *Bioresource Technology* 316, 123496.

Sun, H., Zhang, Y., Yang, Y., Chen, Y., Jeyakumar, P., Shao, Q., Zhou, Y., Ma, M., Zhu, R., Qian, Q., Fan, Y., Xiang, S., Zhai, N., Li, Y., Zhao, Q., Wang, H. 2021. Effect of biofertilizer and wheat straw biochar application on nitrous oxide emission and ammonia volatilization from paddy soil. *Environmental Pollution* 275, 116-640.

Schvartz, C., Decroux, J., Muller, J. C. 2005. *Guide de la fertilisation raisonnée: grandes cultures et prairies*. France Agricole Editions, 125-136.

Suzuki, M., Yamada, H., Kurata, K. 2002. Dictyterpenoids A and B, two novel diterpenoids with feeding-deterrent activity from the brown alga *Dilophus okamurae*. *Journal of Natural Products* 65(2), 121-125.

Tian W., Sun, Q., Xu, D., Zhang, Z., Chen, D., Li, C., Shen, Q., Shen, B. 2013. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 78, 58-66.

Tran, H.T., Lin, C., Bui, X.T., Ngo, H.H., Cheruiyot, N.K., Hoang, H.G., Vu, C.T. 2021. Aerobic composting remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. Current and future perspectives. *Science of the Total Environment* 753, 142-250.

Vargas-García M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management* 30(5), 771-778.

Wang, C., Dong, D., Wang, H., Müller, K., Quin, Y., Wang, H., Wu, W. 2016. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnology for Biofuels* 9, 22.

Yang, X.C., Han, Z.Z., Ruan, X.Y., Chai, J., Jiang, S.W., Zheng, R. 2019. Composting swine carcasses with nitrogen transformation microbial strains: Succession of microbial community and nitrogen functional genes. *Science of the Total Environment* 688, 55-566.

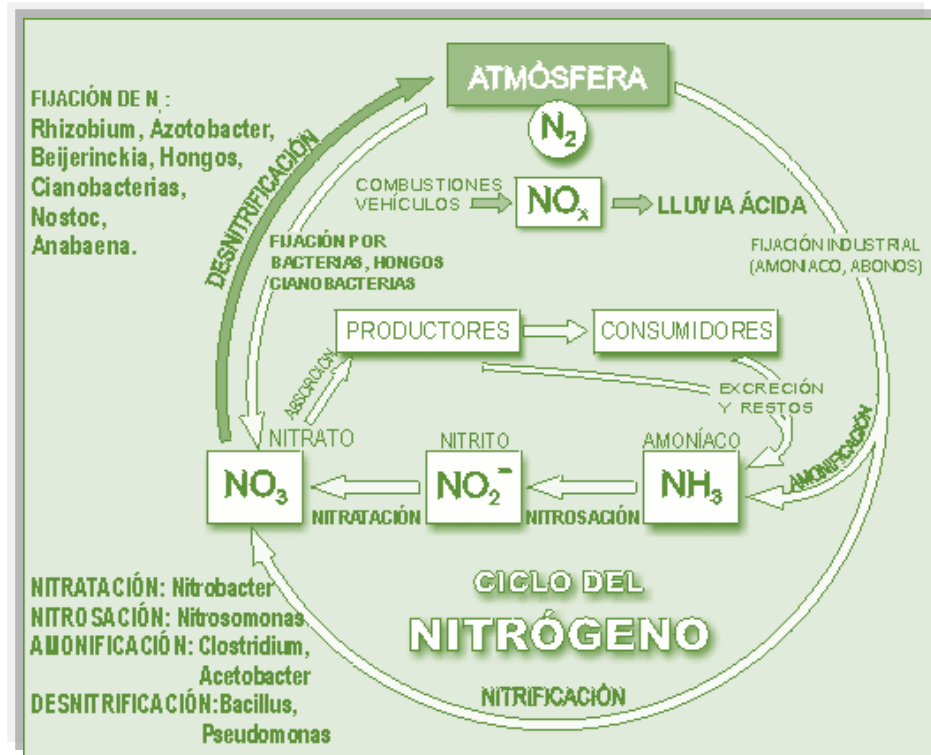
Zhu, L. Yang, H., Zhao, Y., Kang, K., Liu, y., He, P., Wu, Z., Wei, Z. 2019. Biochar combined with montmorillonite amendments increase bioavailable organic nitrogen and reduce nitrogen loss during composting. *Bioresource Technology* 294, 122224.

Zhu, N. 2007. Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice straw. *Bioresource Technology* 98(1), 9-13.

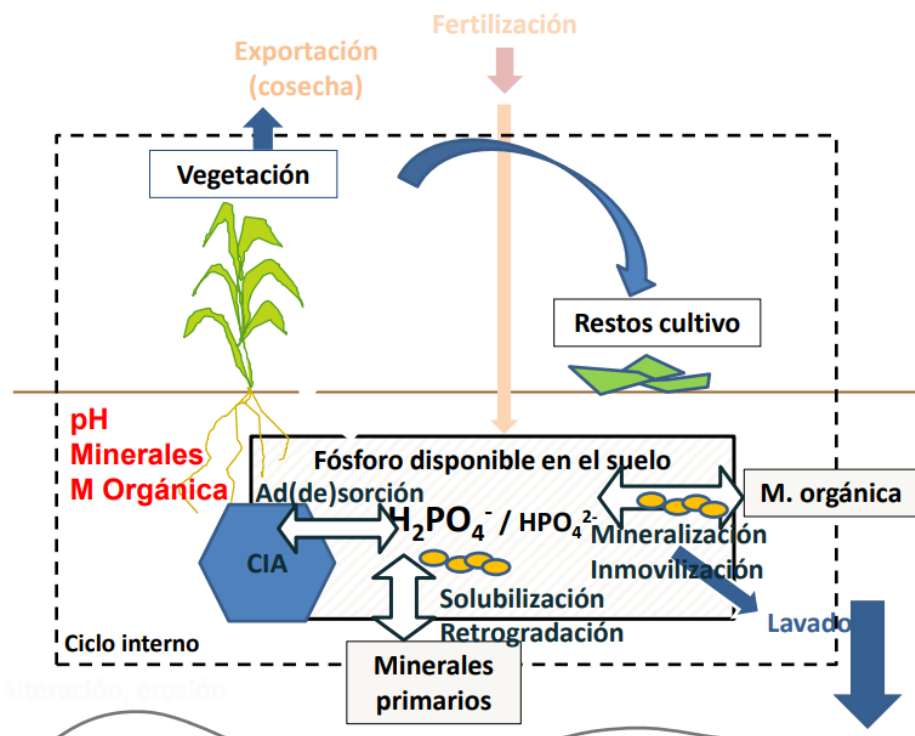


## 7. Anexos

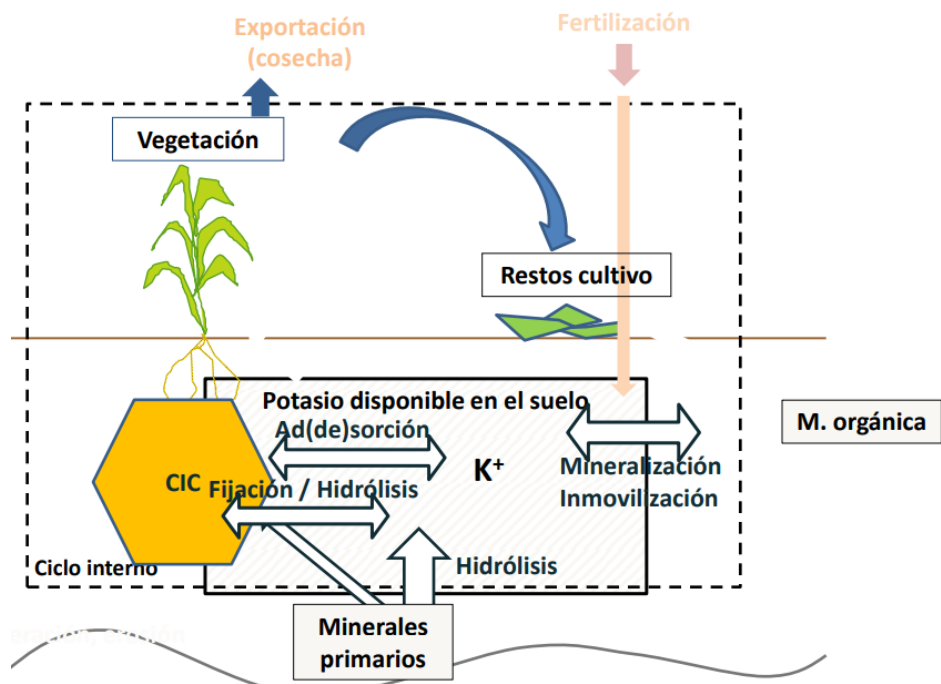
Aquí se muestran los ciclos biogeoquímicos que atañen al rastreo microbiano del trabajo.



### Anexo 1.- Ciclo del nitrógeno (Lenntech, 2021)



## Anexo 2.- Ciclo del fósforo (Schvartz, 2005)



Anexo 3.- Ciclo del potasio (Schvartz, 2005)