

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Biología Fundamental y de Sistemas



Estudio de los procesos biológicos y de la estructura de las comunidades microbianas en el proceso de compostaje de lodos de depuradora de aguas residuales urbanas en sistemas de membrana semipermeable

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigación del Agua

Tatiana Robledo Mahón

Tesis Doctoral, 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Tatiana Robledo Mahón
ISBN: 978-84-9163-885-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/51695>

Título: Estudio de los procesos biológicos y de la estructura de las comunidades microbianas en el proceso de compostaje de lodos de depuradora de aguas residuales urbanas en sistemas de membrana semipermeable

Presentado por: Tatiana Robledo Mahón

Supervisado por: Concepción Calvo Sainz y Elisabet Aranda Ballesteros

Parte de este trabajo ha sido realizado en colaboración con el Departamento de Ecología de Lawrence National Berkeley Laboratory (LNBL). Asimismo, durante la realización de este estudio se ha establecido colaboración con el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba y con el Instituto de Microbiología y Parasitología, de la Universidad de Liubliana, Eslovenia.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia Motriz RNM 7370 de la Junta de Andalucía y se ha llevado a cabo dentro del Grupo RNM-270 de Microbiología Ambiental de la Universidad de Granada. La autora agradece el contrato predoctoral ofrecido por la Junta de Andalucía.

Diseño portada: Patricia Lara Postigo.

Parte de estos resultados han sido publicados:

1. Inmaculada González, Tatiana Robledo-Mahón, Gloria Andrea Silva-Castro, Alfonso Rodríguez-Calvo., M. Carmen Gutiérrez, M. Ángeles Martín, Arturo F. Chica and Concepción Calvo Evolution of the composting process with semipermeable film technology at industrial scale. 2016. *Journal of Cleaner Production*, 115, 245-254.
2. Tatiana Robledo-Mahón, Elisabet Aranda, Chiara Pesciaroli, Alfonso Rodríguez-Calvo, Gloria Andrea Silva-Castro, Jesús González-López and Concepcion Calvo. Effect of semi-permeable cover system on the bacterial diversity during sewage sludge composting. 2018. *Journal of Environmental Management*, 215, 1, 57-67.
3. Tatiana Robledo-Mahón, M. Ángeles Martín, M. Carmen Gutiérrez, Inmaculada González, Manuel Toledo, Elisabet Aranda, Arturo F. Chica and Concepción Calvo. Full-scale study of sewage sludge composting under semi-permeable film: Relationships between microbiological activities and physico-chemical variables. 2018. *Journal of Environmental Management* (en revisión).
4. Tatiana Robledo-Mahón, Cinta Gómez-Silván, Jesús González-López, Gary Andersen, Elisabet Aranda and Concepción Calvo. Dechipering bacterial and fungal community involved in thermophile composting of sewage sludge under semipermeable cover technology. 2018 (en preparación).
5. Tatiana Robledo-Mahón, Elisabet Aranda and Concepción Calvo. Characterization of extracellular enzymes of bacteria and fungi isolated from a composting. 2018 (en preparación).

Parte de estos resultados han sido presentados en los siguientes congresos:

1. Tatiana Robledo-Mahón, Alfonso Rodríguez-Calvo, Gloria Andrea Silva-Castro, Beatriz Pérez-Montoro, Belén Rodelas, Jesús González-López and Concepción Calvo. Microbiological study of sewage sludge composting using micro-porous laminate membrane cover system technology. Presentación de póster en el 6th International Congress of FEMS. Maastricht (Netherlands) celebrado en 2015.
2. Tatiana Robledo-Mahón*, Alfonso Rodríguez-Calvo, Gloria Andrea Silva-Castro Elisabet Aranda, Irene Ortega, Concepción Calvo. Estudio de la diversidad fúngica y bacteriana durante el proceso de compostaje de lodos usando sistemas de membrana semipermeable. Presentación oral* y póster en el XXV SEM 2015 Congreso Nacional de Microbiología. Logroño (España) celebrado en 2015.
3. Tatiana Robledo-Mahón*, Alfonso Rodríguez-Calvo, R. Lucero Camacho-Morales, Elisabet Aranda, Jesús González-López y Concepción Calvo. Producción de enzimas oxidativas en hongos aislados durante el proceso de compostaje. Presentación

oral* en el III Workshop de Jóvenes Biotecnólogos (III WJB) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. Granada (España) celebrado en 2016.

4. Tatiana Robledo-Mahón*, Alfonso Rodríguez-Calvo, Tatiana Robledo-Mahón, Alfonso Rodríguez-Calvo. Evolución de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje de lodos de depuradora: Illumina Next Generation Sequencing. Presentación oral* en las I Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la interdisciplinariedad JIFFI 2016. Granada (España) celebrado en 2016.
5. Tatiana Robledo-Mahón*, Alfonso Rodríguez-Calvo, R. Lucero Camacho-Morales, Elisabet Aranda, Jesús González-López y Concepción Calvo. Evolución de la población fúngica cultivable durante el proceso de compostaje de lodos mediante sistemas de membrana semipermeable: Identificación y caracterización enzimática. Presentación oral* (Key-lecture) en el Congreso IBEROAMERICA 2016 celebrado en Salamanca (España) en 2016.
6. Tatiana Robledo-Mahón, Inmaculada González, Alfonso Rodríguez-Calvo, Jesús González-López, Elisabet Aranda and Concepción Calvo. Enzymatic and phylogenetic characterization of bacteria isolated from composting sewage sludge with semipermeable cover technology. Presentación de póster en el I International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes (BioRemid) celebrado en Granada (España) en 2017.
7. Tatiana Robledo-Mahón, María Martín-García, Darío R. Olicón-Hernández, Alfonso Rodríguez-Calvo, Jesús González-López, Elisabet Aranda and Concepción Calvo. Protease activity of *Bacillus* strains isolated from composting of sewage sludge: effect of culture conditions. Presentación de póster en el I International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes (BioRemid) celebrado en Granada (España) en 2017.
8. Inmaculada González, Tatiana Robledo-Mahón, M. Ángeles Martín and Concepción Calvo. Evolution of the composting process with semi-permeable technology at industrial scale. Presentación de póster en el I International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes (BioRemid) celebrado en Granada (España) en 2017.
9. Tatiana Robledo-Mahón*, Alfonso Rodríguez-Calvo, Concepción Calvo y Elisabet Aranda. Estudio mediante secuenciación masiva de la evolución de la comunidad fúngica durante el proceso de compostaje de lodos de depuradora con cubierta de membrana semipermeable. Presentación oral* en las II Jornadas de Jóvenes Investigadores en Formación (IIJIFFI) celebrado en Granada (España) en 2017.
10. Concepción Calvo, Tatiana Robledo-Mahón, Alfonso Rodríguez-Calvo Maximino Manzanera, Jesús González-López and Elisabet. Composting of sewage sludge with semipermeable film technology: microbial diversity and enzymatic activities throughout the stages of the process. Presentación de póster en el 7th International

Congress of FEMS in association with 26th Congress of the SEM celebrado en Valencia (España) en 2017.

11. Elisabet Aranda*, Tatiana Robledo-Mahón, Darío R. Olicón-Hernández, Alfonso Rodríguez-Calvo, Jesús González-López, Concepción Calvo. Caracterización de la microbiota fúngica durante un proceso de compostaje: estudio del culturoma de interés biotecnológico. Presentación oral* en la IX Reunión de la Red Temática de la lignocelulosa celebrada en Madrid (España) en 2017.

"Lo que es verdaderamente inmoral es haber desistido a uno mismo"

Clarice Lispector

Tabla de contenido

Contenido

Resumen – Summary.....	1
1. Introducción.....	5
1.1 Las aguas residuales.....	7
1.1.1 Tratamiento de las aguas residuales.....	7
1.1.2 Línea de aguas.....	8
1.1.3 Línea de fangos o lodos.....	9
1.2 Composición de los lodos de depuradora.....	11
1.2.1 Carga patógena.....	12
1.2.2 Contenido en materia orgánica y en nutrientes.....	14
1.2.3 Sustancias tóxicas.....	14
1.3 Problemática de lodos de depuradora.....	16
1.4 Destino final de los lodos de depuradora.....	16
1.5 El compostaje como estrategia en el tratamiento de lodos.....	18
1.6 Tipos de pilas de compostaje.....	20
1.7 Factores que afectan al proceso de compostaje.....	21
1.7.1 Material a compostar.....	21
1.7.2 El agente estructurante.....	22
1.7.3 Tamaño de partícula.....	22
1.7.4 Temperatura de operación.....	22
1.7.5 Contenido de humedad.....	23
1.7.6 Relación C/N.....	23
1.7.7 Aireación.....	23
1.7.8 pH.....	24

1.7.9 Olores	24
1.8 Factores biológicos del proceso de compostaje.....	25
1.8.1 Actividad biológica.....	25
1.8.2 Actividad enzimática como indicador de actividad microbiana y enzimas de interés biotecnológico	27
1.8.3 Diversidad microbiana en procesos de compostaje.....	32
2. Objetivos.....	37
3. Material y Métodos	41
3.1 Diseño y construcción de las pilas de compostaje.....	43
3.2 Muestreos	45
3.3 Caracterización físico-química	46
3.3.1 Conductividad (CE) y pH	46
3.3.2 Porcentaje de humedad (%H)	46
3.3.3 Carbono orgánico oxidable (COx)	47
3.3.4 Materia orgánica (MO).....	47
3.3.5 Sólidos volátiles (SV).....	47
3.3.6 Carbono Orgánico Total (COT), Carbono Total (CT) y Carbono Inorgánico (CI).....	48
3.3.7 Nitrógeno total Kjeldahl (NTK)	48
3.3.8 Relación C/N.....	49
3.3.9 Contenido en fósforo total (P ₂ O ₅).....	49
3.3.10 Determinación de metales pesados	50
3.4 Actividades enzimáticas.....	50
3.4.1 Actividad deshidrogenasa	51
3.4.2 Actividad proteasa.....	51

3.4.3 Actividad fosfatasa	52
3.4.4 Actividad β -glucosidasa	52
3.4.5 Actividad arilsulfatasa.....	52
3.5 Caracterización de la comunidad microbiana mediante técnicas dependientes de cultivo.....	53
3.5.1 Enumeración de la microbiota cultivable.....	53
3.5.2 Identificación filogenética de los microorganismos aislados: extracción del ADN genómico, amplificación y secuenciación.....	53
3.5.3 Identificación de los hongos seleccionados	56
3.6 Caracterización de la comunidad microbiana mediante técnicas independientes de cultivo.	57
3.6.1 Extracción de ADN total y secuenciación de las comunidades bacterianas y fúngicas.....	57
3.6.2 Secuenciación y análisis bioinformático.....	58
3.6.3 Estudio de las comunidades víricas	59
3.7 Cribado cualitativo de la producción enzimática extracelular de los aislados durante el proceso de compostaje.....	61
4. Resultados y discusión	65
4.1 Efecto de la cubierta semipermeable sobre las propiedades físico-químicas y biológicas durante el proceso de compostaje de la Pila I.....	67
4.1.1 Monitorización de la temperatura.....	67
4.1.2 Evolución de los parámetros físico-químicos.....	68
4.1.3 Metales pesados.....	71
4.1.4 Determinación de microorganismos patógenos	72
4.1.5 Enumeración de la microbiota cultivable.....	73
4.1.6 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas	75

4.1.7 Actividad enzimática durante el proceso de compostaje.....	79
4.1.8 Estudio de la diversidad microbiana durante el proceso de compostaje mediante técnicas de secuenciación masiva.....	82
4.1.9 Análisis estadístico del efecto de las variables físico-químicas y biológicas en proceso de compostaje	89
4.2 Efecto de la cubierta semipermeable sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas durante el proceso de compostaje de la Pila II.....	93
4.2.1 Monitorización de la temperatura.....	93
4.2.2 Evolución de los parámetros físico-químicos.....	94
4.2.3 Metales pesados.....	97
4.2.4 Determinación de microorganismos patógenos	98
4.2.5 Enumeración de la microbiota cultivable.....	99
4.2.6 Actividades enzimáticas durante el proceso de compostaje	101
4.2.7 Estudio de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje mediante técnicas de secuenciación masiva.....	104
4.2.8 Estudio de la diversidad fúngica durante el proceso de compostaje mediante técnicas de secuenciación masiva.....	112
4.2.9 Estudio estadístico del efecto de las variables del proceso de compostaje de la Pila II.....	121
4.2.10 Estudio de la diversidad vírica durante el proceso de compostaje mediante análisis de secuenciación masiva	124
4.3 Estudio de cepas de interés biotecnológico para la obtención de enzimas extracelulares.....	135
4.3.1 Producción de enzimas extracelulares en las bacterias aisladas en el proceso del compostaje.....	135
4.3.2 Cuantificación de la producción proteasa en las cepas bacterianas identificadas	144
4.3.3 Producción de enzimas extracelulares en los hongos aislados en el proceso del compostaje.....	147

5. Discusión General.....	155
6. Conclusiones- Conclusions.....	169
7. Bibliografía.....	175
8. Material suplementario.....	197

Resumen – Summary

El compostaje es un proceso viable para el tratamiento final de los lodos procedentes de la depuración del agua, en un contexto en el que la tendencia de este residuo tiende a incrementarse. Su uso final como enmienda en suelos representa una opción sostenible desde un punto de vista ambiental y económico y conforme con las nuevas políticas ambientales de reciclaje y revalorización de residuos.

A pesar de existir numerosas tecnologías para el compostaje de lodos de depuradora, el empleo de cubiertas semipermeables representa una tecnología que permite el control de olores y el mantenimiento de la temperatura y humedad en el interior de la pila, lo que puede acelerar dicho proceso. Los microorganismos son los principales responsables, por lo que la monitorización de los cambios poblacionales y su interrelación con las variables operacionales puede representar una herramienta muy útil para optimizar estos procesos.

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de dos pilas de compostaje con lodos de depuradora a escala industrial. En ambas pilas se utilizó la tecnología de cubierta semipermeable conectada con un sistema de insuflación de aire, modificando únicamente los tiempos de compostaje. Se llevó a cabo la monitorización de los parámetros físico-químicos y microbiológicos, como la determinación de las actividades enzimáticas y el estudio de la diversidad microbiana (bacteriana, fúngica y vírica) tanto mediante técnicas dependientes como independientes de cultivo. Finalmente se realizó un cribado de la producción de enzimas extracelulares en los aislados bacterianos y fúngicos obtenidos con el fin de la obtención de enzimas de valor biotecnológico.

Las variables físico-químicas revelaron una alta correlación entre la actividad microbiana y la diversidad, reflejadas en una intensa fase de degradación bajo la cubierta. La diversidad bacteriana y fúngica se vio influenciada principalmente por las altas temperaturas, que favorecieron a las comunidades termotolerantes. La comunidad vírica estuvo caracterizada por la presencia de virus de plantas y bacteriófagos de bacterias entéricas, sugiriendo el importante papel de los virus en el control de las comunidades patógenas.

Composting is a viable process for the final treatment of sewage sludge, in a context in which these wastes tend to increase. The addition of compost in soil represents a sustainable option from an environmental and economic point of view. Likewise, this application is in agreement with new environmental policies of recycling and in the revaluation of waste.

Despite the existence of numerous technologies for the composting of sewage sludge, the use of semipermeable covers represent a technology that allows the control of odors and the maintenance of temperature and humidity inside the system, which can accelerate the composting process. Microorganisms are the main responsible players of the biological transformation, thus, monitoring the changes in the microbial population and their interrelation with operational variables can represent a very useful tool to optimize these processes.

In this work, we carried out the study of two composting piles with sewage sludge at industrial scale. Both piles used the semipermeable cover technology connected with an air insufflation system, and were tested under variable composting times. The monitored physical-chemical and microbiological parameters included the determination of enzymatic activities and the study of microbial diversity (bacterial, fungal and viral population). These variables were tracked by both dependent and independent culture technologies. Finally, the production of extracellular enzymes in bacterial and fungal isolates was studied to obtain enzymes of biotechnological value.

Physico-chemical variables revealed high correlation between microbial activity and diversity, reflected in an intense phase of degradation under the semipermeable cover. The bacterial and fungal diversity was most influenced by the high temperatures, which favored thermotolerant communities. The viral community was characterized by the presence of plant viruses and bacteriophages of enteric bacteria. Results suggest the important role of viruses in the control of pathogenic communities.

1. Introducción

1.1 Las aguas residuales

El agua es un recurso esencial de suma importancia en el desarrollo de la vida. La preocupación sobre la disponibilidad y calidad de este recurso está creciendo a medida que aumenta la presión que se ejerce sobre él. El continuo crecimiento de la población mundial, así como la diversidad de contaminantes que afectan a las aguas hace que crezca la importancia de conservar y preservar este recurso.

Las aguas residuales son el conjunto de aguas procedentes del uso doméstico, industrial, de filtración y pluviales. El tratamiento de las aguas residuales es una necesidad debido a la repercusión que su vertido directo puede ocasionar en los ecosistemas. Tras su depuración en las Estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), se producen los lodos o fangos. El incremento de la población mundial es la principal causa del aumento de volumen de las aguas residuales y en consecuencia de lodos. Para 2020, se estima que el crecimiento de la población global alcanzará los 7900 millones (Dyson, 1996; Gupta *et al.*, 2012) por lo que la legislación vigente tendrá que adaptarse a los requerimientos de la sociedad futura, con el fin de garantizar una correcta gestión de este residuo. En este aspecto, los sistemas de tratamiento de las aguas residuales han ido evolucionando a medida que ha ido aumentando la población, la presión sobre los recursos naturales y en consecuencia, la preocupación por el medio ambiente.

1.1.1 Tratamiento de las aguas residuales

Las aguas residuales se someten a un conjunto de procesos químicos, físicos y/o biológicos en las EDARs. Así, se pueden diferenciar dos líneas de tratamiento: la línea de aguas, destinada a la depuración del agua y la línea de lodos o fangos, destinada a la recolección y acondicionamiento de los lodos.

Según la normativa, el agua tratada tendrá que cumplir con unos parámetros generales indicadores de la materia orgánica, como la demanda biológica y química de oxígeno (DBO₅ y DQO), sólidos en suspensión (SS) y también con parámetros relativos a la concentración de nitrógeno total, como factores claves en la eutrofización de los

ecosistemas. La elección del tipo de tratamiento se adecúa a los requerimientos, al tipo de influente y a los habitantes-equivalentes, para optimizar el rendimiento de la planta. El esquema general de funcionamiento de la línea de aguas y lodos se describe brevemente a continuación (Fig. 1.1) (Kiely, 1999; Masters *et al.*, 2008).

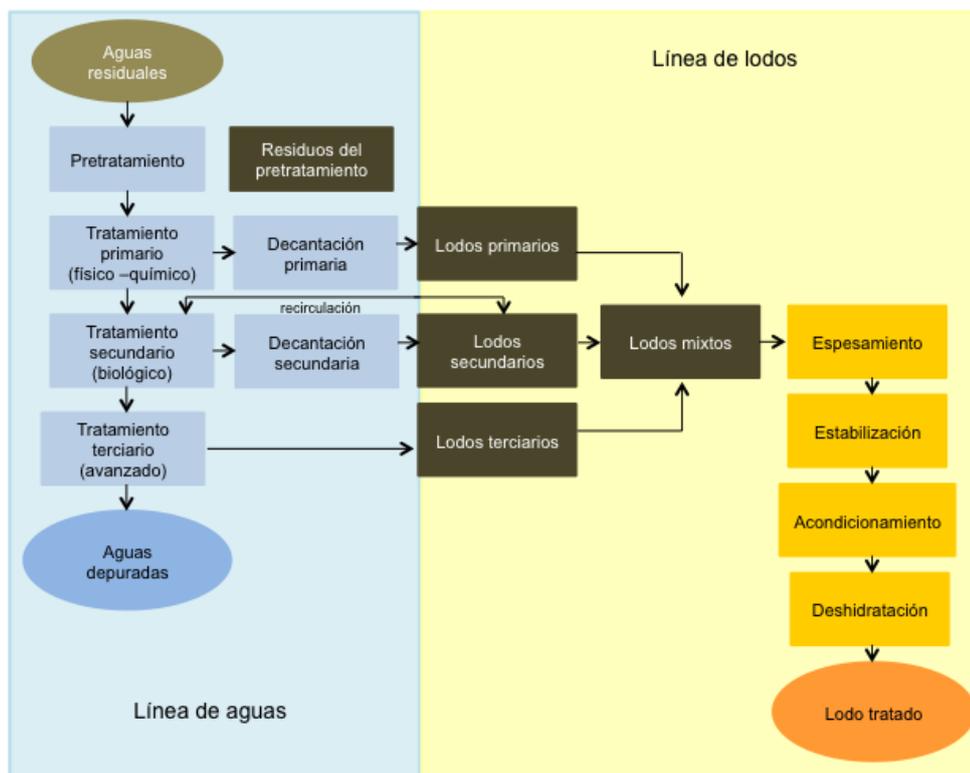


Figura 1.1. Esquema general de las líneas de tratamiento de aguas residuales en una Estación depuradora de agua residual (EDAR).

1.1.2 Línea de aguas

La línea de aguas implica un pre-tratamiento, incluyendo un tratamiento primario, destinado a la eliminación del material más voluminoso del efluente que llega a una EDAR. Los tratamientos secundarios consisten en tratamientos biológicos dirigidos a la eliminación y/o biodegradación de compuestos orgánicos complejos, caracterizados por altos valores de demanda química y biológica de oxígeno (DQO y DBO) (Rigopoulos y Linke, 2002). Por último, el tratamiento terciario está dirigido generalmente a la adecuación del efluente a un determinado uso posterior, por lo que

en este paso se llevan a cabo tratamientos generalmente físico-químicos para eliminar nutrientes.

Las ventajas obtenidas con la creciente implementación de los sistemas de tratamiento acorde con la legislación vigente son indiscutibles, pero la tendencia a incrementar el volumen de aguas residuales que han de ser tratadas, junto con el exponencial crecimiento demográfico, se traducen en un incremento del residuo generado en la depuración: el lodo, dónde se concentran todos los contaminantes eliminados de las aguas (Rulkens, 2008).

1.1.3 Línea de fangos o lodos

Los lodos o fangos constituyen el residuo generado tras el tratamiento primario y secundario de las aguas residuales, correspondiendo con el lodo primario y secundario, respectivamente y con frecuencia, combinados para su tratamiento, obteniendo los lodos mixtos. También se incluye el lodo procedente del tratamiento terciario, si lo hubiese. Los lodos mixtos contienen sólidos en grumos, en escamas y coloidales entremezclados con el agua, metales pesados, polímeros, nutrientes y un amplio abanico de microorganismos (bacterias, virus, protozoos, hongos, parásitos, etc.). La materia orgánica de los lodos de depuradora se compone principalmente de excretas humanas, modificadas por tratamientos de estabilización no biológicos y biológicos. La línea general de fangos viene resumida en la figura 1.1.

• Tratamiento de lodos

En la propia depuradora, el lodo es tratado siguiendo la línea de lodos. Así, entre los tratamientos de este residuo, cabe destacar los siguientes procesos como se recoge en la figura 1.2.

El *espesamiento primario*, en el que los lodos o fangos son concentrados. Esto permite el aumento de la fracción sólida y la reducción de la fracción líquida, lo que facilitará su manejo en pasos posteriores. En ocasiones, este paso puede realizarse posteriormente a la estabilización. Éste se puede hacer mediante decantación, flotación o centrifugación.

El proceso de *estabilización* está enfocado a eliminar los patógenos, reducir olores y eliminar la putrefacción. La materia orgánica en los lodos de depuradora es fácilmente fermentable y debe estabilizarse antes de cualquier tipo de utilización. El éxito de la estabilización suele medirse en base a valores de sólidos volátiles (SV) y en la reducción de microorganismos indicadores de patógenos. Es por tanto un paso crucial en el tratamiento del lodo. La estabilización puede realizarse por métodos físico-químicos, cuyos tratamientos van orientados a reducir el volumen y se obtiene un producto biológicamente estable con un alto valor orgánico. Otros métodos de estabilización frecuentes son la estabilización biológica, como la digestión aerobia y anaerobia. En la digestión aerobia, los microorganismos utilizan la materia orgánica presente en el lodo y la degradan a productos intermediarios, generando energía, CO_2 y NH_3 . Al ser un proceso aerobio, el aire es aportado mediante ventilación con turbinas de aireación. El producto obtenido es un producto humificado y libre de olores. En función de cómo se generen las condiciones aerobias se distingue la digestión aerobia convencional, mediante aireación; la digestión aerobia con oxígeno puro; la digestión aerobia autotérmica termófila, en la que se utiliza el propio calor de la actividad microbiana para llevar el proceso a temperaturas superiores a $50\text{ }^\circ\text{C}$; y la digestión aerobia criófila, en la que se mantienen temperaturas inferiores a los $20\text{ }^\circ\text{C}$. En los procesos de digestión anaerobia, los microorganismos estabilizan la materia orgánica en condiciones anóxicas obteniendo metano y otros productos inorgánicos como CO_2 e H_2 . Suele ser una técnica empleada en residuos con alta carga orgánica, como parte de un tratamiento complementario a los procesos aerobios convencionales. Algunos de los tratamientos de estabilización pueden aplicarse de manera combinada, cuando los objetivos no se alcanzan con un solo tratamiento.

Generalmente, después de la estabilización hay un espesamiento secundario, el cual comprende el mismo proceso que el espesamiento primario y del mismo modo puede ser por gravedad, flotación, drenaje o centrifugación.

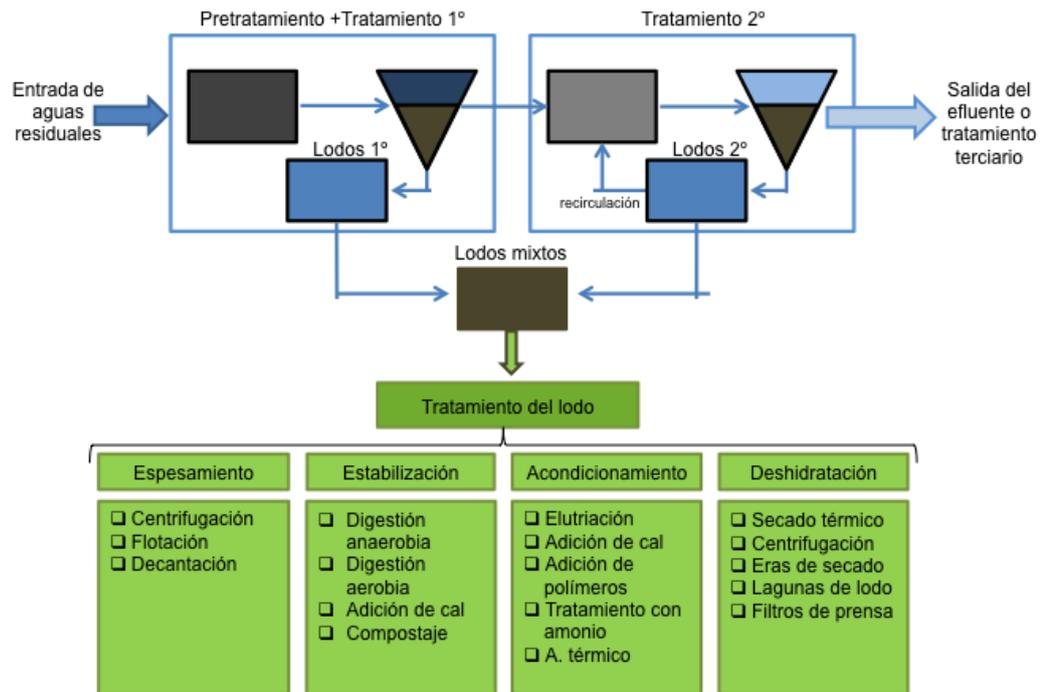


Figura 1.2. Esquema del tratamiento del lodo. Adaptado de Verlicchi y Zambello, (2015)

El *acondicionamiento* es un tratamiento químico o térmico enfocado a mejorar la eficiencia del espesado y la deshidratación. Con ello se eliminan las estructuras coloidales, mediante la adición de floculantes que aporten una estructura más granular.

Finalmente, el lodo se somete a un proceso de deshidratación, con objeto de eliminar la mayor cantidad de agua posible y reducir el volumen para facilitar su manejo y gestión. Existen varios métodos como los filtros prensa, la centrifugación, lechos o eras de secado de lodos, entre otros.

1.2 Composición de los lodos de depuradora

Los lodos tienen una composición heterogénea dependiendo de su procedencia, de la variabilidad de las aglomeraciones urbanas, así como el sistema del tratamiento empleado en la depuradora y tratamiento posterior. Proceden de los decantadores, pueden suponer el 2% del volumen de agua de entrada y tener hasta un 97% de la misma (Masters *et al.*, 2008).

La variabilidad en su composición hace difícil establecer un tratamiento efectivo, dado que las características de cada lodo van a ser diferentes. Algunas de las características a considerar, tanto en su manejo como en su tratamiento, se describen a continuación.

1.2.1 Carga patógena

Las aguas que entran en la EDAR suelen tener una alta carga de patógenos, como virus, bacterias, protozoos y hongos, pudiendo llegar a identificarse hasta más de 150 tipos de patógenos entéricos (Dumontet *et al.*, 1999). La diversidad y el número de patógenos en los lodos va a depender de la salud general de la población de donde proceden las aguas residuales (la incidencia de infecciones dentro de la población o las enfermedades endémicas de esa comunidad), de la procedencia de lugares con actividades especializadas (como centros hospitalarios, mataderos, industrias lácteas) y de factores estacionales (como los que se derivan del turismo, que suponen un gran aumento de la población y que en general afecta a pequeños municipios) (Godfree y Farrell, 2005; Straub *et al.*, 1993).

Durante el tratamiento de aguas residuales, los patógenos se concentran en el lodo producido por la separación de los sólidos de las aguas. Asimismo, muchos microorganismos viven mejor en las aguas residuales cuando están asociados con las partículas sólidas, como el caso de los virus entéricos, de los cuales, el 50% están asociados a los sólidos de estas aguas sin tratar. Según algunos autores, los lodos reúnen condiciones óptimas para la supervivencia de ciertos microorganismos patógenos (Sidhu y Toze, 2009). En consecuencia y debido a la carga patógena del lodo, es necesaria la higienización de los mismos para su uso posterior. La mayoría de los patógenos presentes son reducidos en la fase de acondicionamiento y la carga patógena permitida dependerá del aprovechamiento final del lodo (Strauch, 1991). En la tabla 1.1 se muestran algunos de los patógenos más frecuentes en lodos.

Tabla 1.1. Principales microorganismos patógenos en lodos (Déportes *et al.*, 1995).

Bacterias	Hongos	Virus
<i>Arizona hinshawii</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Enterovirus
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Candida albicans</i>	Poliovirus
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	Coxsackievirus
<i>B. cereus</i>	<i>C. krusei</i>	Echovirus
<i>Brucella</i> sp.	<i>C. tropicalis</i>	Myxovirus
<i>Campylobacter perfringens</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Adenovirus
<i>C. jejuni</i>	<i>Epidermophyton</i> sp.	Astrovirus
<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Geotrichum candidum</i>	Calicivirus
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Microsporium</i> sp.	Coronavirus
<i>Escherichia coli</i>	<i>Phialophora richardsiae</i>	Parvovirus
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Trichosporon cutaneum</i>	Reovirus
<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	<i>Trycophyton</i> sp.	Rotavirus
<i>Listeria monocytogenes</i>		Norwalk virus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		Virus de la hepatitis A
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i>		Virus de la hepatitis B
<i>Proteus</i> sp.		
<i>Providencia</i> sp.		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Salmonella</i> spp.		
<i>Serratia</i> sp.		
<i>Shigella</i> spp.		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Streptococcus</i> spp.		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
<i>V. cholerae</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		

1.2.2 Contenido en materia orgánica y en nutrientes

Se estima que los lodos pueden contener en torno a un 50% de materia orgánica y entre 1-4% de carbono inorgánico.

El nitrógeno orgánico constituye la mayoría del nitrógeno total y el fósforo inorgánico la mayor parte del fósforo total (Singh y Agrawal, 2008). Ambos nutrientes son esenciales y limitantes para el crecimiento de las plantas. Por este motivo, la revalorización de los lodos supone un importante recurso en la mejora de la fertilidad de los suelos. Además, el reciclaje de nutrientes, junto con la materia orgánica puede contribuir a la reducción de las concentraciones de CO₂ atmosférico por el incremento de la concentración de carbono orgánico en suelos (Soriano-Disla *et al.*, 2014).

1.2.3 Sustancias tóxicas

Los lodos también se caracterizan por contener sustancias tóxicas y nocivas, como detergentes, sales, pesticidas y diversos metales pesados. Los contaminantes orgánicos remanentes tras el tratamiento de estabilización del lodo suponen una preocupación creciente, debido a su persistencia y a su potencial de bioacumulación en las cadenas tróficas.

En los últimos años, ha aumentado la preocupación en relación a los compuestos orgánicos persistentes, dentro de los cuales se encuentran los *contaminantes prioritarios*, como sustancias cloradas tipo dioxinas, los furanos, los bifenilos policlorados y los compuestos aromáticos policíclicos (Tabla 1.2). Otro grupo de compuestos orgánicos persistentes de creciente interés son los *contaminantes emergentes*. En ellos se engloban compuestos muy diversos como pesticidas, sustancias que contienen metales, drogas ilícitas, fármacos, disruptores endocrinos o productos de cuidado personal, entre otros (Barceló y López, 2008). Recientes estudios han demostrado que la concentración de determinados contaminantes emergentes es mayor en el lodo que en efluente de las aguas residuales, en gran medida debido a la naturaleza aromática de muchas de estas sustancias, que tienden a unirse a la materia orgánica y a sólidos en suspensión (Schultz *et al.*, 2006; Stasinakis, 2012). Algunos de

estos compuestos son hidrófobos no iónicos, por lo que pueden ser retenidos en el lodo y en la materia orgánica del suelo, reduciendo su biodisponibilidad para las plantas, pero aumentando su persistencia en el suelo, aunque la absorción de estos compuestos orgánicos por las plantas puede estar relacionada con las condiciones del suelo (Wu *et al.*, 2014). Su problemática estriba en que, a día de hoy, no se conoce el alcance de su efecto en la salud humana ni en el medio ambiente (Clarke y Smith, 2011; Deblonde *et al.*, 2011). La variedad de compuestos orgánicos, la falta de conocimiento de los posibles efectos de estos compuestos y la ausencia de legislación de contaminantes emergentes hace necesaria la monitorización y la evaluación continua de estos compuestos, para asegurar que no supongan ningún riesgo para la seguridad alimentaria derivado del uso de lodos estabilizados en suelos agrícolas (Jones-Lepp y Stevens, 2007).

Tabla 1.2. Tabla de contaminantes orgánicos e inorgánicos en lodos procedentes de las aguas residuales. Adaptado de Barceló y López (2008).

Contaminantes prioritarios	Alaclor, atrazina, benceno, difeniléter clorado, tetracloruro de carbono, cloroalcanos (C10-13), clorofeninfos, cloropirifos (cloropirifos-etil), plaguicidas ciclodiene (aldrín, dieldrín, endrín e isodrín), ddt, 1,2-dicloroetano, diclorometano, di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), diurón, endosulfán, hexaclorobenceno, hexaclorobutadieno, hexaclorociclohexano, isoproturón, plomo y sus compuestos, mercurio y sus compuestos, naftaleno, nonilfenoles, octilfenoles, pentaclorobenceno, pentaclorofenol, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs): antraceno, fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)-perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, simazina, tetracloroetileno, tricloroetileno, compuestos del tributyltin, triclorobencenos, triclorometano, trifluralina.
Contaminantes emergentes	Compuestos perfluorados, fármacos (analgésicos, antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos, β -bloqueantes, esteroides y hormonas medios de contraste para Rayos X, reguladores de lípidos, tranquilizantes, etc.), drogas de abuso, productos para la higiene y cuidado personal (agentes de protección de la luz solar, repelentes de insectos, etc), retardantes de llama bromados, pesticidas polares y sus metabolitos.

La presencia de *metales pesados* es uno de los parámetros a considerar, debido al impacto negativo que puede tener en el medio en el que sea aplicado. Entre los metales, cabe destacar el cadmio, zinc, cobre, níquel, selenio, mercurio, arsénico o plomo, cuya presencia ha sido considerada uno de los factores más determinantes en la aplicación de los lodos en suelos, debido a su movilidad y disponibilidad bajo

condiciones usualmente cambiantes del suelo (pH, estado redox) (Illera *et al.*, 2000), pudiendo favorecer la absorción por las plantas y sufrir procesos de biomagnificación pasando a la cadena alimentaria.

1.3 Problemática de lodos de depuradora

Según la Comisión Europea, la producción de lodos en Europa se duplicó entre 1992 y 2010 (desde 5.5 millones a 10 millones de toneladas). Los datos recogidos en el vigente Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) para el período 2016-2022, indican que los lodos procedentes de las EDARs producidos en España (último dato en 2012) superaron el millón de toneladas en materia seca (PEMAR, 2015).

La necesidad de tratar los lodos como residuo ha llevado a incluirlos en la legislación. Frecuentemente son descritos como biosólidos, aunque en esta definición también se pueden incluir los residuos industriales y domésticos de origen orgánico.

En el tratamiento de los lodos hay que considerar que su gestión tiene un papel relevante en el coste total de una EDAR, ya que los costes operacionales de manipulación y tratamiento de este residuo pueden suponer entre el 30-50% del coste total de la planta (Garrido-Baserba *et al.*, 2015; Neyens *et al.*, 2004). A pesar de que en la línea de fangos se lleva a cabo un tratamiento de este residuo, las EDARs o las entidades autorizadas a tal efecto serán las encargadas de asegurar el destino final del mismo, destinado a su reutilización o eliminación. El destino final de este residuo está ligado al marco normativo, cuyo último fin es minimizar los problemas ambientales y de salud pública que puedan derivar de la falta de control sobre éstos.

1.4 Destino final de los lodos de depuradora

Según los datos de 2008, los 26 Estados miembros de la UE produjeron más de 10 millones de toneladas de sólidos secos procedentes del lodo, de los cuales, aproximadamente un 36% fue reciclado en agricultura (Kacprzak *et al.*, 2017).

En España, según los datos procedentes del Registro Nacional de Lodos del año 2012, casi un 80% es destinado a enmienda agrícola, superando los objetivos previstos

en el Plan Nacional Integrado de Residuos del período 2008-2015 (PNIR, 2009) como se muestra en la figura 1.3. El destino del 20% restante se reparte entre la eliminación en vertedero, otros destinos e incineración. Este incremento es el fruto de la integración de la variable ambiental y el principio de jerarquía en gestión de residuos en las políticas actuales, donde prima la revalorización del residuo frente a la eliminación (Directiva 2008/98/CE, 2008; Ley 22/2011).

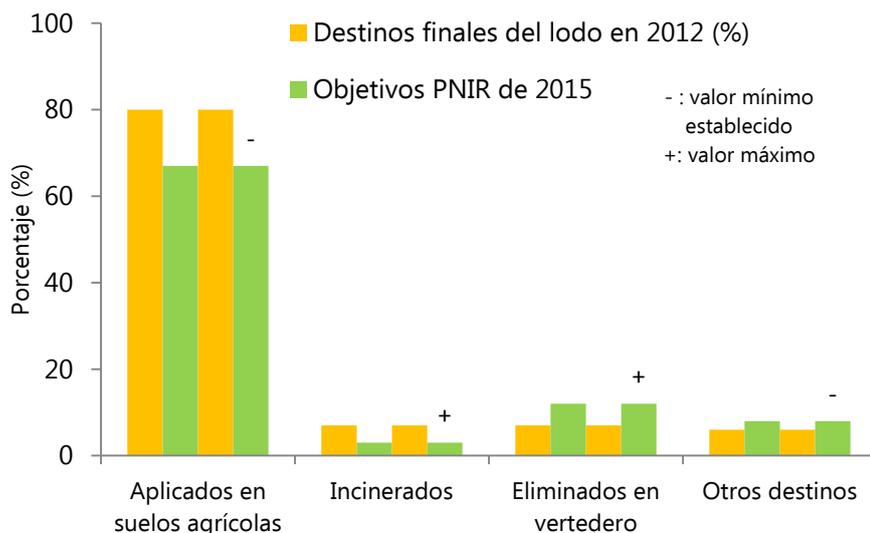


Figura 1.3. Porcentajes de los destinos finales del lodo en 2012 en España en comparación con los objetivos marcados por el Plan Nacional Integrado de Residuos para el período 2008-2015. Adaptado del PNIR (2009).

- *Aplicación de lodos como enmienda orgánica en suelos*

Según el informe del Panel Internacional sobre el Cambio Climático (IPCC, 2001), los suelos agrícolas han perdido más de la mitad de su materia orgánica. Además de los suelos agrícolas, muchas zonas de España sufren una grave degradación del suelo, debido al abandono de cultivos y a las condiciones climáticas desfavorables, como las escasas precipitaciones (inferiores a 300 mm) junto con las altas temperaturas y la topografía. Concretamente, la cuenca Mediterránea tiene una tipología de suelos áridos y cuyos ecosistemas se encuentran condicionados por el agua y por nutrientes como el nitrógeno o el fósforo (Sardans y Peñuelas, 2005).

La aplicación de lodos puede contribuir a la recuperación de los suelos afectados por la pérdida continua de fertilidad y el bajo contenido de materia orgánica, mejorando la calidad de los suelos y favoreciendo su fertilidad (Lazcano *et al.*, 2008). En consecuencia, puede considerarse la enmienda agrícola como una de las alternativas viables para la revalorización de este residuo y más beneficioso desde un punto de vista ambiental y económico, ya que su uso permite sustituir el uso de fertilizantes de origen químico y revalorizar un residuo (Metcalf y Eddy, 1991). Además, su aplicación puede hacerse extensible también a áreas forestales y terrenos para la recuperación de tierras.

Para su uso como enmienda de suelos, los lodos deberán cumplir con las restricciones de la legislación en materia del uso de fertilizantes, como se determina en el Plan Estatal Marco de Residuos vigente en la actualidad (PEMAR, 2015). En este caso, el tratamiento de la línea de fangos suele ser una estrategia ineficaz para estabilizar el lodo, por tanto, suele ser sometido a tratamientos posteriores. Dentro de las estrategias descritas para la estabilización del lodo, las más frecuentes e idóneas para este fin son los tratamientos de estabilización biológicos, como la digestión aeróbica, anaerobia termófila y el compostaje. Estas técnicas permiten la obtención de un producto orgánico de mayor aplicación como enmienda agrícola, a diferencia de las técnicas de estabilización físico-químicas.

1.5 El compostaje como estrategia en el tratamiento de lodos

De manera habitual, el lodo digerido ha sido aplicado al suelo. Sin embargo, la aplicación directa tras la digestión puede ocasionar efectos negativos, debido mayoritariamente a la presencia de compuestos recalcitrantes, metales como Cu y Zn y a que el lodo digerido es inestable bajo condiciones ambientales normales. De este modo, su aplicación prolongada en suelos puede ocasionar la concentración de metabolitos e incluso olores desagradables debido a la presencia de gases como SH_2 o NH_3 .

La estabilización del lodo mediante digestión aeróbica y anaeróbica proporciona un producto todavía fluido, por tanto, no hay reducción del volumen y la materia

orgánica no está completamente estabilizada. Además, la digestión no garantiza la completa destrucción de microorganismos patógenos si no es termófila, la cual requiere un mayor gasto de energía (Dumontet *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2004).

El compostaje es uno de los tratamientos más frecuentes en lodos. Consiste en un proceso biológico de oxidación de la materia orgánica de manera natural y en condiciones aeróbicas. Para ello, se pueden usar lodos frescos o estabilizados tras la digestión aeróbica o anaeróbica. Durante este proceso, los microorganismos degradan y descomponen los residuos orgánicos originando un producto final estabilizado denominado compost, el cual es un producto maduro, desodorizado, higiénico, libre de patógenos, fácil de almacenar y comercializable.

En las últimas décadas, el compostaje ha ganado interés como estrategia para reducir el volumen de los residuos y obtener fertilizantes orgánicos de gran calidad, que pueden ser almacenados y utilizados de manera segura (Dumontet *et al.*, 1999; Sahlström *et al.*, 2004). Así, con este proceso se incrementa la estabilización de la materia orgánica, se destruyen los patógenos y se generan fertilizantes de bajo coste con aplicación agrícola (Karadag *et al.*, 2013). Además, la estabilización previa de los lodos mediante el compostaje, mejora la conservación del carbono orgánico, favoreciendo el aumento de la actividad microbiana del suelo después de la adición de materia orgánica. Este hecho puede considerarse un efecto positivo para la recuperación de suelos con bajo contenido de materia orgánica, cubierta vegetal escasa y cuando el objetivo es la protección del suelo (Sánchez-Monedero *et al.*, 2004). El aporte de materia orgánica permite integrar nutrientes a los ciclos naturales, además de mejorar las propiedades físicas del suelo como la porosidad, la densidad o la retención del agua.

Varios estudios han obtenido compost que cumplen las características de calidad de acuerdo con la legislación a partir del compostaje del lodo, como es el caso del estudio de Villar y colaboradores (2016), en el que seleccionando varios residuos de partida, obtuvieron los mejores valores de maduración con este residuo.

Otra opción viable es combinar algunas de las estrategias mencionadas anteriormente para incrementar la eficiencia, como la combinación de la digestión anaerobia con el proceso de compostaje y obtener una estabilización completa (Dutta *et al.*, 2016). En un estudio llevado a cabo por Cukjati y colaboradores (2012), sobre compostaje a partir de lodos digeridos anaeróticamente, obtuvieron unos resultados positivos en cuanto a la correcta mineralización de la materia orgánica y a un coste menor que la incineración. Además, algunos estudios indican que si el lodo digerido posteriormente es compostado y después utilizado como enmienda agrícola mejora la disponibilidad del aporte del nitrógeno en el suelo (Cukjati *et al.*, 2012; Nkoa, 2014). El compost obtenido de a partir de lodos de depuradora debe cumplir con los parámetros recogidos en el RD 506/2013 (Anexo I) para ser utilizado como enmienda orgánica.

1.6 Tipos de pilas de compostaje

Según diferentes autores (Kiely, 1999; Vallini y Pera, 1985) se pueden diferenciar a grandes rasgos dos tipos de sistema de pilas de compostaje: abiertos o cerrados.

Los *sistemas abiertos* o compostaje al aire libre, son los sistemas más tradicionales. En estos procesos, el aire se suministra a la pila a través de volteos periódicos o por aireación, para asegurar que el proceso tenga una correcta oxigenación, que proporcione las condiciones aeróbicas. El más empleado suele ser el compostaje en hileras con volteos, en las que el compostaje suele durar 3 meses y la maduración unos 12 meses. Los volteos se realizan cuando la temperatura alcanzada en la pila es elevada o por falta de oxígeno, pudiendo reducirse entre 5-10 °C la temperatura de la pila. Los volteos se repiten periódicamente, puesto que la temperatura puede ascender a los pocos días.

Las pilas estáticas con aireación activa reciben una aportación externa de aire mediante aireación forzada, a través de un sistema de ventilación, generalmente conectado por el suelo. Suelen conectarse a un termostato, para insuflar aire cuando se alcanza una determinada temperatura. Para evitar los posibles olores, las pilas pueden cubrirse con cubiertas de diferentes materiales, como las cubiertas de material Gore-

Tex®, recientemente empleados para favorecer la retención de humedad. En las pilas estáticas con aireación pasiva, ésta se da mediante procesos de convección natural y se ve favorecido por la porosidad de la matriz y la estructura de la pila, que permiten el intercambio de gases mediante evaporación o difusión. El proceso general de degradación puede durar entre 4-6 semanas.

En los *sistemas cerrados*, también conocidos como compostaje en cámara cerrada, hay un control detallado de los parámetros operacionales, permitiendo reducir el tiempo de compostaje. Sin embargo, requieren unas instalaciones más costosas que los sistemas abiertos.

En la presente tesis doctoral el estudio se ha realizado con una pila abierta estática con aireación forzada y cubierta de Gore-Tex®.

1.7 Factores que afectan al proceso de compostaje

Para que el compostaje sea efectivo, hay que considerar una serie de parámetros que condicionan el proceso y por tanto son factores requeridos para su control. El monitoreo de estos parámetros puede ser útil para la optimización del proceso y mejora de la calidad del producto final, lo que puede repercutir directamente en una reducción de los costes.

Entre los factores que determinan el proceso de compostaje, podemos diferenciar parámetros físico-químicos, como la humedad o la temperatura y parámetros biológicos, que varían en función de la etapa y de la comunidad de microorganismos que gobiernan el proceso. Estos parámetros están interconectados y el control de los mismos puede ser clave para el desarrollo y optimización del compostaje (Agnew y Leonard, 2003; de Bertoldi *et al.*, 1983; Sidhu y Toze, 2009). Los principales parámetros físico-químicos y componentes del proceso se describen a continuación:

1.7.1 Material a compostar

El residuo a compostar tiene que tener un contenido orgánico y de nutrientes apropiado, o en su defecto, estas características serán aportadas por el agente estructurante. Los microorganismos necesitan una fuente de carbono y de nutrientes

para su crecimiento. En función del material a compostar, se seleccionará el estructurante para lograr concentraciones adecuadas en la mezcla inicial. En este sentido y como se ha descrito anteriormente, el lodo procedente de las depuradoras tiene una composición variable y rica en materia orgánica y nutrientes.

1.7.2 El agente estructurante

El proceso de compostaje requiere un material estructurante que proporcione porosidad, permeabilidad y estructura al residuo a compostar, y en el caso del lodo, éste compensará el contenido de humedad del material de partida. Frecuentemente se emplean virutas de madera, paja, serrín, hojas, papel, residuos sólidos o residuos vegetales. Los materiales de partida son un factor importante, ya que de ellos va a depender el aporte nutricional y por tanto, la actividad de los microorganismos involucrados en la degradación (Gea *et al.*, 2007; Vargas-García *et al.*, 2010).

1.7.3 Tamaño de partícula

El material de partida requiere una homogeneización y a veces una trituración para un tamaño óptimo de partícula. Esta característica gana relevancia si se utilizan distintos materiales de partida con distinta textura y estructura. Para facilitar la degradación microbiana, es recomendable un tamaño de partícula pequeño, puesto que la superficie relativa será mayor, favoreciendo la velocidad de oxidación biológica, que es directamente proporcional a la superficie expuesta al agente degradador (de Bertoldi *et al.*, 1983).

1.7.4 Temperatura de operación

La temperatura es un factor primordial y el más influyente en este proceso, ya que va a ser determinante de la microbiota implicada en cada fase. En el proceso de compostaje se libera calor y se producen una serie de variaciones en la temperatura. Dada la importancia de este parámetro, tradicionalmente las etapas en un proceso de compostaje se pueden diferenciar en distintas fases: mesófila, termófila, de enfriamiento y maduración, que se explicarán con más detalle en el apartado 1.8.1.

1.7.5 Contenido de humedad

Para mantener el proceso de forma óptima es necesario mantener unos valores de humedad, puesto que los microorganismos necesitan la presencia de agua para llevar a cabo la biodegradación de la materia orgánica (Karadag *et al.*, 2013). Según Luo y colaboradores (2008), los valores óptimos de humedad deben estar comprendidos entre 25-80%, mientras que Gajalakshmi y Abbasi (2008) proponen un rango más estrecho entre 45-60%.

1.7.6 Relación C/N

La relación C/N es un parámetro fundamental en la eficacia del proceso de compostaje y de gran influencia en la calidad del compost obtenido. Varios autores lo han propuesto como un indicador de la madurez del mismo. Hortenstine y Rothwell (1973), propusieron que valores próximos a 15 pueden ser considerados como valor de estabilización del compost. En la actualidad, la relación C/N se utiliza para determinar el grado de degradación o descomposición de la materia orgánica. Bernal y colaboradores (2009) han precisado que el balance nutricional está definido principalmente por este ratio, fijando un rango de valores óptimos entre 25-35, teniendo en cuenta que los microorganismos degradan la fracción orgánica de carbono en una relación de 30 partes de carbono por cada parte de nitrógeno. Sin embargo, posteriormente este ratio se ha utilizado como índice de degradación.

1.7.7 Aireación

La aireación va a proporcionar las condiciones aerobias que favorezcan el metabolismo microbiano. También contribuye a controlar los niveles de humedad y a disminuir la temperatura.

El proceso de compostaje es un proceso aeróbico. No obstante, determinadas condiciones operacionales pueden disminuir las concentraciones de oxígeno, permitiendo el crecimiento de microorganismos anaerobios o aerobios facultativos. Generalmente, como resultado de estos procesos anaerobios fermentativos se generan

compuestos responsables de los malos olores. La emisión de olores es más característica en la primera fase del compostaje, donde la gran cantidad de materia orgánica degradable puede agotar el oxígeno disponible, generando compuestos como sulfuros y nitratos, responsables del mal olor e inhibiendo la eficacia de la degradación (Scaglia *et al.*, 2011). Los valores óptimos de oxígeno se encuentran entre el 15-20%, mientras que valores inferiores, inhiben el proceso de degradación.

1.7.8 pH

Durante el proceso de compostaje, el pH puede presentar oscilaciones, considerándose valores de 6-8 dentro de un rango óptimo.

Inicialmente pueden darse valores inferiores, debido a la acidificación del medio por la producción de ácidos por los microorganismos en la primera fase de la degradación. Estos ácidos serán consumidos en las fases posteriores (El Fels *et al.*, 2014). Valores de pH más alcalinos pueden darse después de la etapa termófila, debido a la producción de amoníaco como consecuencia de la mayor actividad metabólica, aunque las altas temperaturas favorecen su volatilización.

El pH influye en el crecimiento microbiano siendo valores de pH en torno a la neutralidad (6-7.5) favorables para el crecimiento bacteriano, mientras que valores de pH ligeramente ácidos (5-6) son preferibles para el crecimiento fúngico. Los lodos de depuradora generalmente tienen valores más altos de pH, debido al alto contenido en amonio libre que presentan. El compost final tiene que tener un pH en torno a 8-9, como resultado de la mineralización del sustrato orgánico y la formación de sustancias húmicas que actúan como tampones (Nikaeen *et al.*, 2015).

1.7.9 Olores

Los olores pueden variar según los materiales de partida, siendo más comunes en sistemas abiertos de compostaje que en sistemas en cámaras cerradas. Los olores proceden de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV). Este problema se puede solucionar con la ventilación del compost o cubriendo el sistema con cubiertas. Puede suponer un problema cuando la planta de compostaje se encuentra cercana a

poblaciones, pudiendo transportar los olores en función de la dirección predominante del viento.

1.8 Factores biológicos del proceso de compostaje

1.8.1 Actividad biológica

Como se ha descrito anteriormente, la temperatura es uno de los factores determinantes en la diversidad de la comunidad microbiana, ya que seleccionará a aquellos microorganismos capaces de adaptarse. Pero además, la dinámica y diversidad microbiana durante el compostaje estarán condicionadas por factores como el oxígeno y el sustrato orgánico (Hassen *et al.*, 2001; Villar *et al.*, 2016).

Atendiendo a la actividad biológica se pueden distinguir varias fases en el compostaje (Ryckeboer *et al.*, 2003):

- *Fase de biodegradación acelerada*

En esta fase se incluyen las fases mesófila y termófila, con temperaturas cercanas a los 40 y 70 °C, respectivamente (Fig. 1.4).

La *fase mesófila* se caracteriza por la disponibilidad de materia orgánica y de compuestos fácilmente metabolizables. Las condiciones aeróbicas y el aporte de materia orgánica favorecen la actividad y el crecimiento de microorganismos en un rango de temperatura entre los 20-30 °C. Estos compuestos fácilmente degradables, como los azúcares, proteínas, lípidos y almidón, procedentes de la materia orgánica, se agotan durante esta fase (Steger *et al.*, 2005). La comunidad microbiana predominante es aeróbica y diversa debido a las condiciones óptimas de partida para el desarrollo de la microbiota autóctona.

El aumento de la actividad microbiana conlleva un incremento paulatino de la temperatura, como consecuencia de la liberación del calor en la degradación, dando lugar a la *fase termófila*, en la que la temperatura puede alcanzar los 80 °C (Fig. 1.4). Esta temperatura puede eliminar gran parte de la comunidad microbiana mesófila, incapaz de crecer en este rango de temperatura. Además, permite la eliminación de

patógenos así como la higienización del compost, ya que muchos patógenos son sensibles a estas temperaturas si se mantienen durante un tiempo prolongado. A partir de los 60 °C, los principales responsables de la actividad microbiana son los actinomicetos y las bacterias formadoras de esporas. En esta etapa hay un descenso de gran parte de la comunidad fúngica, sensibles a las altas temperaturas. La degradación en esta fase la llevan a cabo los organismos termófilos, hasta finalizar el proceso de degradación (MacCready *et al.*, 2013).

- *Fase de maduración*

El cese de la actividad microbiana permite el enfriamiento de la pila alcanzando una segunda fase mesófila (Fig. 1.4).

Tras la fase termófila, el agotamiento del material orgánico disminuye la actividad microbiana y en consecuencia la temperatura desciende progresivamente dando lugar a la *fase de maduración*. Dentro de esta se puede distinguir una *fase de enfriamiento* o la segunda fase mesófila, caracterizada por una recolonización de la microbiota mesófila, con un rango de temperatura en torno a los 25 °C. La fase de maduración se lleva a cabo a temperatura ambiente, generalmente al aire libre y con volteos periódicos para bajar la temperatura. Los microorganismos mesófilos llevarán a cabo procesos de humificación de la materia orgánica. El consumo de compuestos de fácil degradación y el agotamiento de polímeros sencillos en las primeras fases, hace que las fuentes de energía en esta fase estén limitadas a compuestos de estructura compleja. Por ello, los sustratos principales de esta fase son compuestos recalcitrantes de difícil degradación como la celulosa o la lignina procedentes del agente estructurante. Tras finalizar esta fase se obtendrá un compost maduro y estabilizado que puede ser almacenado sin ningún tratamiento.

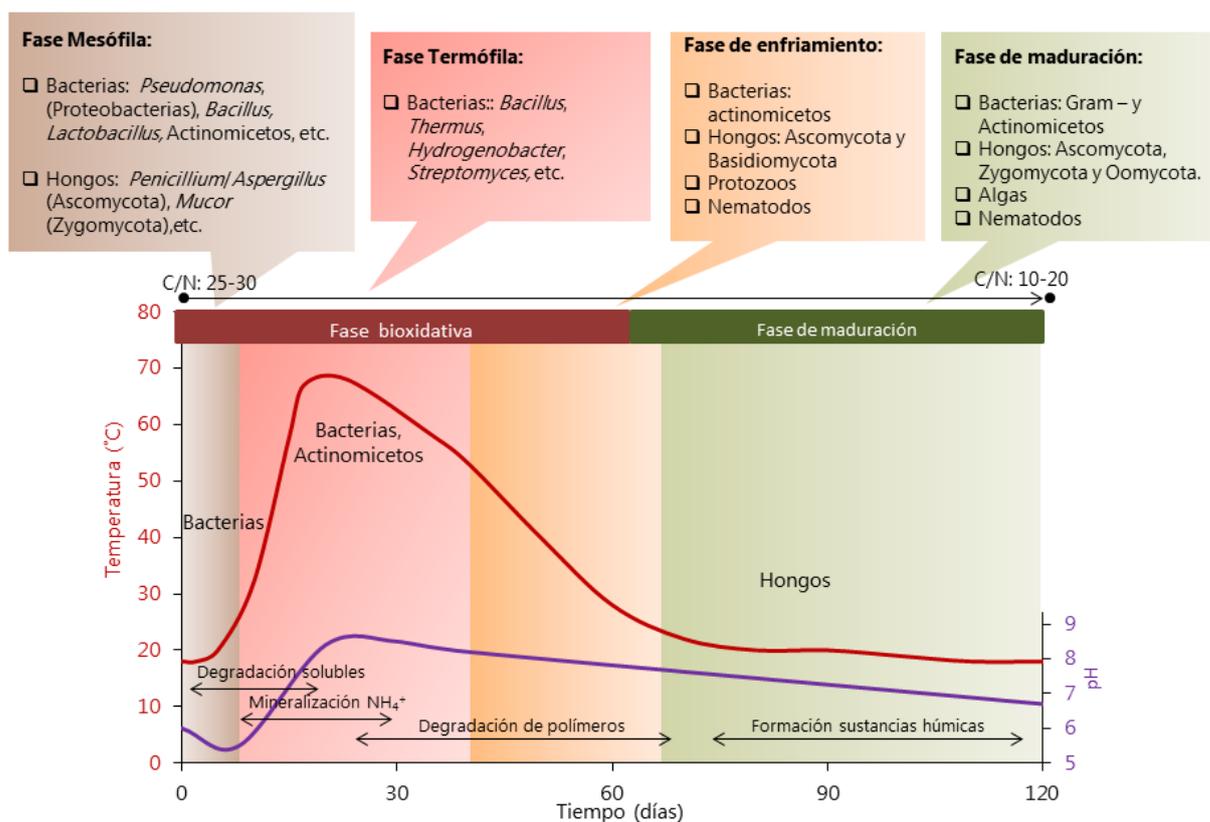


Figura 1.4. Sucesión microbiana y evolución del proceso de compostaje. Adaptado de Moreno y Mormeneo (2008).

1.8.2 Actividad enzimática como indicador de actividad microbiana y enzimas de interés biotecnológico

Durante el compostaje, los microorganismos utilizan tanto enzimas extracelulares como intracelulares para hidrolizar la materia orgánica y transformar compuestos con estructuras complejas en moléculas más sencillas, que puedan ser asimiladas y finalmente conduzcan a la mineralización de las mismas (He *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2006). Las actividades enzimáticas son consideradas sensores de la degradación, ya que son una medida indirecta de la disponibilidad de nutrientes, así como del estado de la microbiota y de las condiciones físico-químicas. Dichas propiedades han permitido su uso frecuente como indicadores del estado del compost, de la evolución de la materia orgánica y de la diversidad funcional (Castaldi *et al.*, 2008; Cayuela *et al.*, 2008; Mondini *et al.*, 2004; Ros *et al.*, 2006). Una gran variedad de hongos y bacterias pueden fragmentar y oxidar macromoléculas utilizando una batería de enzimas hidrolíticas, oxidativas, liasas y transferasas (Pérez *et al.*, 2002). Las enzimas

deshidrogenasas, β -glucosidasa, proteasas, fosfatasas y arisulfatasas, son las principales propuestas para el seguimiento de los procesos de biodegradación y las comunidades microbianas (Mohammadi, 2011).

Pero además, algunas de estas enzimas presentan un alto valor biotecnológico, siendo las pilas de compostaje un ambiente singular para la búsqueda de microorganismos con estas capacidades. Así, entre las enzimas con mayor interés, destacan aquellas que pueden aplicarse a procesos de biosíntesis, a la industria alimentaria y a la aplicación en la creciente industria de las biorrefinerías, como hemicelulasas, pectinasas y enzimas oxidorreductasas, como las lacasas y peroxidasas.

- Enzimas indicadoras de actividad microbiana

- *Deshidrogenasa*

El proceso de deshidrogenación consiste en la oxidación biológica de compuestos orgánicos por transferencia del hidrógeno desde un sustrato al aceptor y se lleva a cabo por las enzimas deshidrogenasas (EC 1.1.) (Tabatabai, 1994).

La actividad deshidrogenasa es una de las más ampliamente utilizadas como indicador de la actividad microbiana y del metabolismo oxidativo en suelos, ya que, al ser exclusivamente intracelular, está vinculada a células viables, mostrando por tanto la actividad de la población activa (Skujiniš y Burns, 1976).

La actividad deshidrogenasa ha sido propuesta como un parámetro indicador de la evolución de la actividad biológica en el compost (Tiquia, 2005), pudiendo aportar información relevante sobre el estado de la materia orgánica durante la evolución del proceso y ha sido propuesta incluso como un método interesante de monitorización en procesos de compostaje, ya que está implicado en el índice estático de respiración (Barrena *et al.*, 2008; Castaldi *et al.*, 2008).

- *β -glucosidasa*

Las glucosidasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y producidas por microorganismos generalmente heterótrofos, como hongos y plantas,

obteniendo en su hidrólisis productos de bajo peso molecular, que constituyen una importante fuente de energía para los microorganismos del suelo.

Dentro de las glucosidasas, las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) son más predominantes que las α -glucosidasas y β -galactosidasas (Tabatabai, 1994). La enzima β -glucosidasa está involucrada en la sacarificación de la celulosa, concretamente en el último paso tras la acción de la β -1,4-glucanasa, liberando glucosa a partir de la celobiosa. La celobiosa es una fuente importante de energía para los microorganismos capaces de utilizar este azúcar directamente. La celulosa es el principal componente de las plantas por tanto, es una de las enzimas determinantes en el ciclo del carbono y es muy útil como indicadora del estado de la materia orgánica (Turner *et al.*, 2002).

La mayoría de los microorganismos con capacidad lignocelulósica (principalmente hongos basidiomicetos y ascomicetos) son capaces de producir estas enzimas, también algunos hongos pertenecientes al orden *Mucorales* (Subdivisión *Mucoromycotina*). Además de indicadora, otras enzimas de esta familia de celulasas, como la endo-1,4- β -D-glucanasa, exo-1,4- β -d-glucanasa, presentan un creciente interés biotecnológico debido a la variedad de aplicaciones que poseen (Bhat y Bhat, 1997).

- *Proteasas*

Las proteasas (EC 3.4.2.21-24) son enzimas involucradas en el ciclo del nitrógeno y actúan hidrolizando proteínas, utilizando péptidos y oligopéptidos de los aminoácidos como sustrato.

Una gran cantidad de microorganismos son capaces de producir proteasas para la degradación de las proteínas, generalmente ligadas a la liberación de amonio. La actividad proteasa tiene un pH óptimo de 8 y un óptimo de temperatura de aproximadamente 55-60 °C (Hoffmann *et al.*, 2001; Ladd y Butler, 1972). Debido al alto peso molecular de las proteínas, la degradación es inicialmente extracelular. Una vez producidos compuestos con bajo peso molecular, como aminoácidos, éstos pueden ser utilizados intracelularmente.

Estas enzimas, además de indicadores de actividad microbiana, tienen un gran interés biotecnológico (Gupta *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011).

- *Fosfatasas*

Las fosfatasas (EC 3.1.3.1) (ácidas y alcalinas en función del rango de pH óptimo), hidrolizan compuestos del fósforo orgánico, transformándolo a fósforo inorgánico, el cual es la única forma asimilable por las plantas. El lodo contiene diferentes macronutrientes, entre los cuales, el fósforo se encuentra en un 70% aproximadamente en forma orgánica (Lima *et al.*, 1996). La implicación de estas enzimas es por tanto fundamental en la mineralización del fósforo y en la inmovilización en la propia materia orgánica, el cual puede constituir un factor limitante en el metabolismo de plantas y de microorganismos (Criquet *et al.*, 2007; Eivazi y Tabatabai, 1977).

Este hecho hace que sean enzimas importantes desde una perspectiva agrícola y puedan ser consideradas como un buen indicador del estado biológico del suelo y de los procesos de compostaje (Albrecht *et al.*, 2010; Kızılkaya y Bayraklı, 2005).

- *Arilsulfatasa*

La actividad arilsulfatasa (EC 3.1.6.1) es la encargada de la hidrólisis de ésteres sulfato (en forma de polisacáridos sulfatados, sulfatos fenólicos, lípidos, etc.) y su transformación a formas inorgánicas asimilables durante el metabolismo de las plantas.

Algunos estudios han relacionado esta actividad con el contenido de materia orgánica, ya que es producida principalmente por microorganismos (Perucci y Scarponi, 1983) y juega un papel importante en el ciclo del azufre (Bandick y Dick, 1999).

- *Algunas enzimas de interés biotecnológico*

- *Hemicelulasas*

Las hemicelulasas (E.C. 3.2.1.8) son un grupo diverso de enzimas que hidrolizan hemicelulosas, un componente estructural de la lignocelulosa (Fig. 1.7). Las xilanasas son las enzimas más importantes dentro de este grupo, e hidrolizan el xilano,

compuesto por unidades de D-xilopiranosilo unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos. Las xilanasas tienen muchas aplicaciones biotecnológicas, principalmente en biorrefinerías, es por ello que son objeto de multitud de investigaciones (Khare *et al.*, 2015; Shallom y Shoham, 2003).

- *Pectinasas*

Las pectinas conforman un amplio grupo de polímeros de naturaleza mayoritariamente sacaroídica, cuya principal característica es la heterogeneidad y presentan altas proporciones de ácido D-galacturónico, hasta un 70%. Se encuentran altamente interconectadas con la matriz lignocelulósica, por lo que su degradación tampoco ha de considerarse como un proceso aislado.

Las pectinasas (EC 3.2.1.15) son un grupo de enzimas heterogéneas encargadas de hidrolizar estas sustancias. Muchos microorganismos y plantas superiores poseen estas enzimas. Poseen multitud de aplicaciones comerciales, sobre todo en la industria alimentaria y papelera. La mayoría de los microorganismos utilizados para fines comerciales son hongos (Jayani *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2013).

- *Amilasas*

El almidón es un polisacárido constituido por dos fracciones diferenciadas, amilasa y amilopectina. Ambas están formadas por unidades de glucosa, pero se diferencian en la unión de los enlaces.

Las enzimas encargadas de la degradación de estos componentes son las amilasas (EC 3.2.1.1), que se dividen en α -amilasas, β -amilasas, amiloglucosidas y pululanasa, siendo las dos primeras las más importantes desde el punto de vista microbiano. Las amilasas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1995).

- *Lacasas*

Las lacasas (EC 1.10.3.2) forman parte de un gran grupo de enzimas denominadas enzimas oxidasas multicobre azules y catalizan la oxidación de sustratos aromáticos,

concomitantemente con la reducción de oxígeno molecular a agua. Están clasificadas como enzimas auxiliares de las enzimas carbohidrato activas. Catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, incluidos mono-, di- y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato. Las lacasas se caracterizan por una amplia inespecificidad y un rango variable de sustratos oxidables en función del organismo que la produzca. Son producidas por muchos tipos de organismos, incluidos hongos y bacterias. Estas enzimas se valoran cada vez más en numerosas aplicaciones biotecnológicas, como procesos de biorremediación, debido a su amplio rango de aplicaciones (Fernández-Fernández *et al.*, 2013; Giardina *et al.*, 2010; Mayer y Staples, 2002).

- *Peroxidasas*

Estas enzimas (EC 1.11.1.7), también auxiliares, engloban a aquellas que utilizan el peróxido de hidrógeno como aceptores de electrones. En ellas se incluyen: manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y peroxidasa versátil (peroxidadas clase II), entre otras. Estas enzimas son muy inespecíficas, y se ha documentado que están implicadas en la transformación de compuestos aromáticos (Hofrichter, 2002), incluidos colorantes, BTEX y compuestos emergentes y que por tanto tienen gran interés desde un punto de vista biotecnológico.

1.8.3 Diversidad microbiana en procesos de compostaje

- *Diversidad bacteriana y fúngica*

El compostaje se caracteriza por la intervención y sucesión de muchas y diferentes comunidades microbianas. Este hecho se ha puesto de manifiesto por diferentes tipos de técnicas, tanto cultivo-dependientes como cultivo-independientes.

Los estudios en la composición de las comunidades microbianas mediante técnicas dependientes de cultivo se han centrado principalmente en el estudio de las comunidades bacterianas. Hoy día se sabe que las comunidades fúngicas, de arqueas y virus, tienen un papel clave en la comprensión del proceso global, y que no es posible entender estos procesos sin el estudio de todas las comunidades, sus interacciones y el

papel de cada uno de los microorganismos en el proceso. Además, el estudio de los microorganismos cultivables tiene una gran relevancia desde el punto de vista, no solo de la sucesión de comunidades, si no de la obtención de cepas de interés.

- Técnicas dependientes de cultivo

Los análisis de procesos de compostaje basados en técnicas dependientes de cultivo han puesto de manifiesto que *Bacillus* es uno de los géneros más frecuentes y predominantes en distintos procesos de compostaje, con presencia sobre todo en las etapas termófilas. Pero además, aparecen microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Flavobacterium* y *Rhodococcus* en sistemas de compostaje a escala real de residuos vegetales, frutícola y de jardín (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Durante el compostaje de lodos de depuradora también se ha detectado la presencia de especies de *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Tiago *et al.*, 2004). De forma similar, en el compostaje de basura orgánica a escala real con sistemas de aireación, las especies más importantes pertenecieron a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* (Bhatia *et al.*, 2013), a diferencia de otros procesos de compostaje de residuos agrícolas, dónde los géneros *Microbacterium* y *Bacillus* fueron los más predominantes (López-González *et al.*, 2014).

El análisis de las comunidades fúngicas, con técnicas dependientes de cultivo, muestra una distribución cronológica y éstas predominan durante la última etapa de descomposición. En estos procesos destacan especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Mucor* (Ryckeboer *et al.*, 2003). También, en el compostaje de residuos agrícolas llevado a cabo por Jurado y colaboradores (2014), detectaron especies de *Cladosporium*, *Gibellulopsis*, *Ochrocladosporium*, *Plectosphaerella* y *Scopulariopsis*, poniéndose de manifiesto que los ascomycetos están omnipresentes durante todo el proceso. Este hecho se confirma en estudios de compostaje de material lignocelulósico, destacando la presencia de *Sordariomycetes* y *Eurotiomycetes* y siendo el género *Penicillium* el más representativo (López-González *et al.*, 2015). En este estudio otros

géneros representativos fueron *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Spordiobolus* y *Sporobolomyces*, pertenecientes a la división *Basidiomycota*.

- Técnicas independientes de cultivo

En los últimos años, con el avance en las técnicas independientes de cultivo se ha podido profundizar más en el conocimiento de la microbiota no cultivable en procesos de compostaje, aplicando tanto técnicas *fingerprinting* (DGGE y TGGE) como las nuevas técnicas de secuenciación masiva (Illumina, Ion Torrent, principalmente).

En procesos de compostaje con sistemas de aireación forzada, el análisis mediante técnicas independientes de cultivo mostró la presencia de *Clostridium*, *Acidovorax*, *Butyrivibrio*, *Pedobacter*, *Empedobacter* y *Flavobacterium*, además de *Bacillus* y *Actinobacteria* (Bhatia *et al.*, 2013). En compostaje de residuos sólidos urbanos a escala real y con sistema de aireación, se observó un predominio de especies de *Bacillus* y *Acinetobacter* en las etapas tempranas del proceso y los géneros *Sphingobacterium*, *Thermobacillus* y *Citrobacter* (Karadag *et al.*, 2013).

En relación a la comunidad fúngica, existen menos estudios con este tipo de técnicas en comparación a la comunidad bacteriana. Los estudios de esta comunidad han confirmado que su diversidad varía en el tiempo, con mayor predominancia en etapas mesófilas que termófilas, destacando la recolonización de la fase de maduración debido a su capacidad para romper compuestos de difícil degradación (Villar *et al.*, 2016). En procesos de compostaje de residuos de la industria avícola se determinó la presencia de *Saccharomycetales* durante todo el proceso y una predominancia de *Sordariales* en la etapa termófila, siendo *Ascomycota* el filo dominante (Gu *et al.*, 2017).

• *Diversidad vírica*

Otra comunidad importante es la comunidad de virus, una de las comunidades que más interés está tomando en los últimos años, debido a la ausencia de legislación en el compost final y a su potencial como origen de enfermedades emergentes. No existen estudios completos de comunidades víricas en procesos de compostaje, sin embargo, existen algunos estudios sobre comunidades víricas patógenas en lodos de

depuradoras (Tabla 1.1). Algunos estudios han mostrado que los bacteriófagos fueron lo virus más abundantes en biosólidos con una abundancia del 60% mientras que los virus potencialmente patógenos en humanos fueron inferiores al 0.1% (Bibby *et al.*, 2011).

El papel de los virus también puede ser importante durante el proceso de compostaje, en el control de las comunidades microbianas pudiendo tener un efecto positivo si los virus afectan a las comunidades de bacterias y hongos patógenos (Heringa *et al.*, 2010).

2. Objetivos

El estudio de la diversidad microbiana implicada en procesos de compostaje representa una herramienta muy útil como parámetro para conocer y mejorar la madurez del compost y para comprender los procesos de biodegradación que tienen lugar en dicho proceso.

A pesar de los estudios anteriormente descritos, no existen estudios en procesos de compostaje bajo cubierta, así como la relación entre la sucesión de las comunidades bacterianas, fúngicas y víricas con los parámetros físico-químicos.

Por ello, el objetivo principal de esta tesis es el estudio de la microbiota y los procesos biológicos de un proceso de compostaje utilizando lodos de depuradora conducido a escala real y combinado con la tecnología de la cubierta semipermeable combinado con aireación forzada, como sistema de ventilación. Para alcanzar este objetivo principal se establecieron los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización físico-química y biológica -usando técnicas dependientes e independientes de cultivo- y estudio de la interrelación de estos parámetros en el proceso de compostaje bajo cubierta semipermeable de lodos de depuradora a escala real.
2. Optimización del proceso de compostaje bajo cubierta semipermeable de lodos de depuradora: Caracterización físico-química y biológica, análisis de la diversidad bacteriana, fúngica y vírica durante el proceso. Estudio de la interrelación de estos parámetros.
3. Estudio de las enzimas de interés industrial a partir de aislados bacterianos y fúngicos obtenidos en una pila de compostaje a escala real bajo cubierta semipermeable, mantenida durante 30 días bajo cubierta.

3. Material y Métodos

3.1 Diseño y construcción de las pilas de compostaje

En este estudio se construyeron 2 pilas de compostaje, Pila I y Pila II. Estas pilas se construyeron a escala real en la planta de Biosólidos "El Salao" de la empresa Biomasa del Guadalquivir S.A, dentro del término municipal de Vegas de Genil, en Granada.

El material de partida utilizado para el compostaje fueron lodos desecados parcialmente estabilizados y estructurante vegetal. Los lodos empleados se obtuvieron de la EDAR Sur y Oeste de EMASAGRA, Granada. Estos fueron estabilizados previamente en la propia EDAR mediante digestión anaerobia mesófila y deshidratación mediante centrifugación. El estructurante vegetal consistió en una mezcla de restos de astilla y poda triturada de jardines.

En la construcción de las pilas se empleó un camión bañera y una pala cargadora para mezclar los 250 Tm de lodo con una proporción volumétrica 1:3 (p:v) de estructurante vegetal, también conocido como bulking. Las dimensiones finales de la pila fueron 30 x 8 x 1.5 m (Fig. 3.1a).

La cubierta utilizada en la pila fue una cubierta Gore®, consistente en una capa de tejido Gore-Tex® laminada y compuesta por tres membranas que presentan microporos entre dos textiles muy robustos y transpirables (Fig 3.1b), lo que le aporta una gran resistencia al agua y permite mantener el contenido de humedad dentro de la pila. Este tejido fue suministrado por la compañía Alemana Gore-Tex®.



Figura 3.1. Imágenes del montaje de la pila en la planta de biosólidos "El Salao". Pila descubierta a) y pila con cubierta Gore-Tex® b).

Las pilas se construyeron sobre una serie de conductos de ventilación conectados a ventiladores (modelo CAM 545-2T-3, Sodeca) con una potencia de 2.2 Kw que distribuían el aire mediante tubos perforados. Este sistema también se conoce como

"on floor" por su localización a ras del suelo. Los lixiviados a través de estos conductos se recogieron en una balsa de lixiviados conectada para tal efecto (Fig 3.2).



Figura 3.2. Conductos de aireación en el suelo a). Ampliación de la tubería b). Ventilador para suministrar aireación a la pila c). Conexión del ventilador a la pila d).

El primer proceso de compostaje (Pila I) tuvo una duración total de 190 días, de los cuales 60 días se mantuvo bajo la membrana semipermeable y con el sistema de insuflación de aire. Transcurrida esta fase, la pila se trasladó a la zona de maduración con ayuda de una pala excavadora, donde permaneció al aire libre durante 130 días hasta alcanzar la duración total de 190 días. Durante la fase de maduración se realizaron varios volteos con ayuda de una pala excavadora.

La duración de la Pila II fue de 120 días, de los cuales 30, se mantuvo bajo la cubierta semipermeable conectado al sistema de insuflación de aire. Transcurrido este tiempo se retiró la cubierta, siendo en este caso la duración de la fase de maduración de 90 días, hasta completar el tiempo total del proceso (120 días). Durante esta fase se hicieron distintos volteos.

La temperatura y la humedad se monitorizaron mediante sondas introducidas en la pila y conectadas a un software que permitió el monitoreo continuo de estos parámetros. Con este sistema se obtuvieron registros de 5 profundidades de la pila (0, 25, 50, 75 y 100 cm de profundidad).

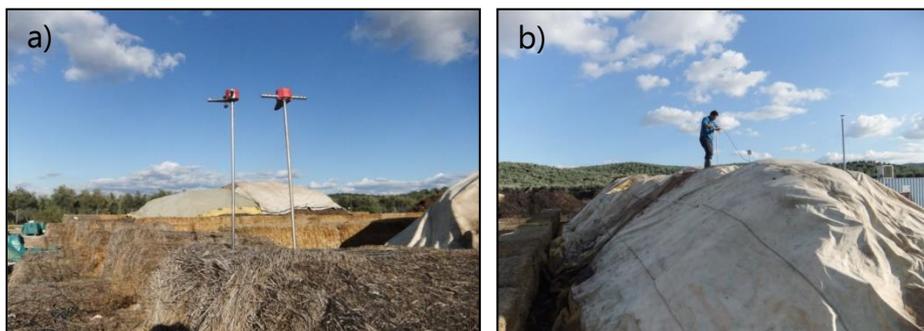


Figura 3.3. Sondas para la monitorización de las temperaturas conectadas a la pila a) y cubrición de la pila de compostaje b).

3.2 Muestreos

Para el muestreo se siguió la metodología de la muestra compuesta. Previamente a la construcción de las pilas, se tomaron muestras del material a compostar para su caracterización, correspondientes a las muestras de lodo y del estructurante vegetal. Los muestreos se realizaron a distintos tiempos del proceso, tal y como se muestra en la tabla 3.1.



Figura 3.4. Imágenes del material a compostar de la Pila II, lodo a) y estructurante vegetal b).

Las muestras se tomaron con ayuda del personal técnico de la empresa Biomasa del Guadalquivir. Se tomó 1 kg de muestra en 5 puntos distintos de la pila, correspondientes a distintas profundidades. Cada muestra se mezcló en una bolsa de polietilenglicol y se transportaron en frío hasta el laboratorio para su posterior análisis. Una parte de la muestra se almacenó a 4 °C para los análisis inmediatos y otra se congeló a -20 °C para análisis posteriores.

Tabla 3.1. Tiempos de muestreo y fases del proceso de compostaje realizado en las Pilas I y II.

Pila I		Pila II	
Días de muestreo	Fase del proceso	Días de muestreo	Fase del proceso
Tiempo 0	Materiales de partida	Tiempo 0	Materiales de partida
Tiempo 1	Tiempo inicial	Tiempo 0	Tiempo inicial
Tiempo 5	Inicio de fase termófila	Tiempo 1	Inicio del proceso
Tiempo 15	Fase termófila	Tiempo 2	Inicio del procesoa
Tiempo 30	Fase bajo cubierta	Tiempo 5	Inicio fase termófila
Tiempo 60	Eliminación de la cubierta)	Tiempo 8	Fase termófila
Tiempo 120	Fase de maduración	Tiempo 15	Fase bajo cubierta
Tiempo 190	Final fase de maduración	Tiempo 30	Eliminación del a cubierta
		Tiempo 40	Inicio fase de maduración
		Tiempo 70	Fase de maduración
		Tiempo 120	Final fase de maduración

3.3 Caracterización físico-química

La caracterización físico-química de los materiales a compostar y de las muestras obtenidas durante el ciclo de compostaje, se llevó a cabo en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba. Para la determinación de estos parámetros se siguió la metodología descrita por el departamento de Agricultura del Consejo Americano de Compostaje (The US Department of Agriculture, The US Composting Council, 2002) y tal y como se describe en González y colaboradores (2016).

3.3.1 Conductividad (CE) y pH

Para determinar la conductividad se utilizó un conductímetro modelo micro CM 2200. El valor obtenido se expresó en $\mu\text{S cm}^{-1}$. El pH se midió con un pHmetro "Crison" modelo Digit 2001.

3.3.2 Porcentaje de humedad (%H)

El porcentaje de humedad se determinó mediante diferencia de peso húmedo y peso seco de la muestra tras el secado en una estufa de desecación a 60 °C.

3.3.3 Carbono orgánico oxidable (COx)

Para la determinación del carbono orgánico oxidable (COx) la muestra se oxidó mediante la adición de $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 en un digestor a una temperatura de 160 °C durante 2 h. Tras la digestión, la muestra se diluyó en 250 mL de los cuales, 20 mL se utilizaron para valorar el exceso de $K_2Cr_2O_7$ utilizando sal de Mohr ($(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$) y ferroína como indicador. Paralelamente, se determinó un blanco al que se añadieron todos los reactivos sin la muestra, para determinar la cantidad total de dicromato añadido. Los resultados se expresaron en porcentaje (%COx) siguiendo la fórmula:

$$\%COx = \frac{(B - A) N_{sm} 0.003 250}{20 m} 100$$

Dónde:

B= volumen de sal de Mohr usados en la valoración de la muestra (mL)

A= volumen de sal de Mohr usados en la valoración del blanco (mL)

N_{sm} = normalidad de la sal de Mohr

m= peso de la muestra inicial (g).

3.3.4 Materia orgánica (MO)

Este parámetro se calcula a partir del carbono orgánico oxidable (COx), siendo la materia orgánica el resultado obtenido del carbono orgánico oxidable (%) por el coeficiente de Waksman.

$$\%MO = COx W$$

Dónde:

W es el Coeficiente de Waksman= 1.728;

COx= carbono orgánico oxidable (%).

3.3.5 Sólidos volátiles (SV)

Los sólidos volátiles se calcularon mediante la diferencia entre el porcentaje de los sólidos totales (%ST) y los sólidos minerales (%SM). Los ST se calcularon por diferencia de pesada a partir de un volumen de muestra secado en estufa a 100 °C durante 24 h.

Por diferencia de pesos húmedo y seco se estableció el %ST, tanto minerales como volátiles.

$$\%ST = \frac{(A - B)}{m} \times 100$$

Dónde:

A= peso de la muestra seca (con el recipiente) (g);

B= peso del recipiente (g);

M= peso de la muestra inicial (g).

El porcentaje de SM se obtuvo tras la calcinación de las muestras en estufa a 550 °C hasta un peso constante.

$$\%SM = \frac{(C - D)}{m} \times 100$$

Dónde:

C= peso de la muestra calcinada (con el recipiente) (g);

D= peso del recipiente (g);

m= peso de la muestra inicial (g).

Los SV se obtienen mediante la diferencia de los ST y SM:

$$\%SV = \%ST - \%SM$$

3.3.6 Carbono Orgánico Total (COT), Carbono Total (CT) y Carbono Inorgánico (CI)

La determinación del carbono orgánico total (COT) incluye tanto la fracción de carbono inorgánico (CI) como orgánico (CO) y se expresó en porcentaje. Esta determinación está basada en la oxidación catalítica del carbono total (CT) a dióxido de carbono (CO₂) que se detecta mediante espectrometría de infrarrojos, utilizando un analizador de carbono Shimadzu modelo TOC-V_{CSH}. LD. El %COT se calculó por la diferencia entre el CT y CI.

3.3.7 Nitrógeno total Kjeldahl (NTK)

Para el cálculo del N total se utilizó el método Kjeldahl, que consiste en la digestión de 1 g de muestra durante 3 h a 350 °C en presencia de ácido sulfúrico

(H₂SO₄) y del catalizador Kjeldahl (Cu-Se). Posteriormente, la muestra se destiló en presencia de solución al 35% de hidróxido sódico (NaOH), hasta alcanzar un pH aproximadamente de 9.5. El producto destilado se recogió con una solución 0.1 N de H₂SO₄ en exceso. Después, mediante valoración en presencia de naranja de metilo como indicador, se valoró el exceso de H₂SO₄. El porcentaje de NTK se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%NTK = \frac{[(V_{(H_2SO_4)} \times N_{(H_2SO_4)}) - (V_{(NaOH)} \times N_{(NaOH)})] \times 14 \times 0.1}{m}$$

Dónde:

V_{H₂SO₄} = volumen de ácido sulfúrico en el que se recoge el destilado (mL);

N_{H₂SO₄ (H₂SO₄)} = normalidad del ácido sulfúrico en el que se recoge el destilado.

V_{NaOH} = volumen de NaOH gastado en la valoración (mL);

N_{NaOH} = normalidad del NaOH utilizado en la valoración;

m = masa de la muestra (g).

3.3.8 Relación C/N

La relación C/N se calculó considerando el cociente del Carbono orgánico oxidable (%CO_x) y el Nitrógeno Kjeldahl (%NTK).

$$C/N = \frac{\%CO_x}{\%NTK}$$

3.3.9 Contenido en fósforo total (P₂O₅)

La estimación del fósforo se hizo mediante gravimetría (US Department of Agriculture, The US Composting Council, 2002). Un gramo de muestra se sometió a una digestión a 350 °C durante 3 h en presencia de 5 mL de ácido nítrico y 25 mL de ácido sulfúrico. Una vez alcanzados los 150 °C, se añadieron 3 g de nitrato potásico. Terminado el tiempo de digestión, las muestras se dejaron enfriar y posteriormente se añadieron 150 mL de agua destilada. La muestra se volvió a digerir por segunda vez a 110 °C durante 10 min. Terminada la fase de digestión, las muestras se enfriaron y filtraron. Un volumen de 25 mL del filtrado se transfirió a un nuevo recipiente donde se adicionaron 100 mL de agua destilada y 50 mL de reactivo de molibdato de quinoleína. Las muestras se llevaron a ebullición y se mantuvieron durante 1 min. La muestra se

dejó enfriar manteniendo en agitación y se pesó. A continuación la muestra se filtró y los filtros se secaron en un horno a 250 °C durante 30 min, se volvieron a pesar una vez fríos. Para el cálculo se utilizó la siguiente reacción:

$$\%P_2O_5 = \frac{(M - B) \times 3.207}{P/10}$$

Dónde:

M= peso (g) del precipitado de fosfomolibdato de quinoleína (peso del filtro con el residuo);

B= peso (g) del precipitado sin el residuo;

P= peso (g) de la muestra en los 25 mL de filtrado.

3.3.10 Determinación de metales pesados

La presencia de cobre (Cu), cadmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) se determinó mediante la técnica de espectrometría de absorción atómica de llama, utilizando un modelo AAnalyst 100/300 (Perking-Elmer). Tras una digestión previa de 1 g de muestra, ésta se calcinó en un horno durante 1 h a 550 °C. Se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico al 37% y se secó en una placa calefactora a 150 °C. Finalmente se añadieron 20 mL de una solución 2N de ácido clorhídrico. Las muestras se filtraron con papel de filtro y se enrasó hasta un volumen de 100 mL con agua ultra-pura. Esta solución se analizó mediante espectrofotometría de llama. Las absorbancias se compararon con la recta obtenida en la curva patrón obtenida mediante soluciones estándar para cada metal ensayado.

3.4 Actividades enzimáticas

Para determinar las actividades enzimáticas, las muestras se tamizaron con tamiz de <2 mm y se secaron al aire (excepto para la proteasa que se mantuvo húmeda). Las actividades enzimáticas se determinaron por métodos colorimétricos utilizando un espectrofotómetro Unicam 5625 UV/VIS. Todos los resultados se expresaron como $\mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de peso seco en relación al sustrato correspondiente para cada actividad y se representó el valor medio obtenido a partir de tres repeticiones analíticas.

3.4.1 Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa (EC 1.1.1.2) se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Casida y colaboradores (1964). Para ello se utilizaron 20 g de la muestra con 0.2 g de CaCO_3 (Acros Organics, Bélgica). A 6 g de muestra se añadió 1 mL de una solución de cloruro de trifenil tetrazolio al 3% (TTC, Sigma-Aldrich, Alemania) y 2.5 mL de agua destilada. Los tubos se agitaron e incubaron a 37 °C durante 24 h en oscuridad. Posteriormente se añadieron 10 mL de metanol (Panreac AppliChem, Alemania) y se agitaron durante 1 min. La suspensión se filtró y el trifenil formazán (TPF) liberado de la reducción de TTC se midió espectrofotométricamente a 485 nm. Los resultados se extrapolaron a partir de una curva patrón de TPF (Fluka Biochemika, Suiza).

3.4.2 Actividad proteasa

La actividad proteasa (EC 3.4.2.21-24) se analizó utilizando el procedimiento desarrollado por Ladd y Butler (1972) basado en la cuantificación de los aminoácidos liberados. A cada gramo de muestra se añadieron 5 mL de tampón Tris (50 mM; pH 8.1) (Acros Organics, Bélgica) y 5 mL de solución de caseinato de sodio al 2% (Acros Organics, Bélgica). Los tubos con la mezcla se incubaron durante 2 h a 50 °C en agitación. La reacción se detuvo añadiendo 5 mL de una solución al 15% de ácido tricloroacético (TCA) (VWR Prolab Chemicals, Francia). La suspensión se centrifugó (12000 rpm, 10 min) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo recipiente donde se adicionó un reactivo alcalino (compuesto por NaOH 0.06 M, Na_2CO_3 al 5%, CuSO_4 al 0.5%, H_2O y tartrato sódico potásico al 1%; Scharlau, Scharlab, España) que se incubó 15 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 mL de una solución al 33% de reactivo de Folin-Ciocalteu (VWR Prolab Chemicals, Francia). Finalmente, las muestras se filtraron y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 700 nm y se estimó la liberación de tirosina en referencia a una curva patrón (Scharlau, Scharlab, España).

3.4.3 Actividad fosfatasa

La actividad fosfomonoesterasa se determinó midiendo las actividades fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) y fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) según Eivazi y Tabatabai (1977) mediante la cuantificación de la producción de *p*-nitrofenol (Fluka Biochemika, Suiza) a partir de *p*-nitrofenilfosfato (Acros Organics, Bélgica). Para ello, se mezcló 1 g de muestra con 0.25 mL de tolueno (Lab-Scan Analytical Science, Irlanda) y 4 mL de tampón universal modificado (MUB; pH 6.5) para la fosfatasa ácida y pH 11 para la fosfatasa alcalina y 1 mL de la solución 0.025 M *p*-nitrofenilfosfato. Tras 1 h de incubación a 37 °C, se añadió 1 mL de una solución 0.5 M de CaCl₂ (VWR Prolab Chemicals, Francia) y 4 mL de una solución 0.5 M de NaOH. La solución se mezcló y se filtró. La cantidad de *p*-nitrofenol se midió espectrofotométricamente a 400 nm y se calculó mediante una curva de calibración hecha con soluciones estándar de *p*-nitrofenol.

3.4.4 Actividad β -glucosidasa

La determinación de la actividad β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) se basó en el mismo fundamento que la actividad fosfatasa pero usando el *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (0.0025 M) como sustrato (Sigma-Aldrich, Alemania), (Eivazi y Tabatabai, 1988). Se partió de 1 g de muestra y se adicionaron 0.25 mL de tolueno y 4 mL de MUB (pH 6) y con 1 mL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. Tras 1 h de incubación a 37 °C, se añadió 1 mL de CaCl₂ 0.5 M y 4 mL de tampón Tris 0.1 M. La cantidad de *p*-nitrofenol se calculó como se describe en el método de la fosfatasa, en base a una curva de calibración.

3.4.5 Actividad arilsulfatasa

La actividad arilsulfatasa (EC 3.1.6.1) se determinó cuantificando la liberación de *p*-nitrofenol, utilizando *p*-nitrofenil sulfato como sustrato. A 1 g de muestra se añadió 1 mL de dicho sustrato (0.025M), 0.25 mL de tolueno y 4 mL de tampón acetato (0.5 M; pH 5.8). Las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se añadió 1 mL de CaCl₂ 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M. La muestra, previamente filtrada, se midió en el

espectrofotómetro a 400 nm. Los resultados se calcularon utilizando la curva patrón de concentraciones estándar de *p*-nitrofenol (Tabatabai y Bremner, 1970).

3.5 Caracterización de la comunidad microbiana mediante técnicas dependientes de cultivo

3.5.1 Enumeración de la microbiota cultivable

La enumeración de la microbiota cultivable se realizó mediante la técnica de dilución y siembra en placa. Para ello, 1 g de muestra se suspendió en 9 mL de solución salina estéril (0.9% NaCl).

Para el recuento de bacterias, 0.1 mL de las distintas diluciones se inocularon en placas de tripticasa de soja agar (TSA, Oxoid™). Las placas se incubaron a 30 y 55 °C para distinguir entre microorganismos mesófilos y termófilos, durante 48 h (González *et al.*, 2016).

Para el recuento de hongos se emplearon dos medios de cultivo, el Caldo Czapek-Dox (ZD, Difco™) adicionado con 14 g L⁻¹ de Agar (Difco™) y el medio extracto de malta y agar (MEA, VWR Prolab Chemicals, Francia), suplementado con 50 μ L⁻¹ de estreptomina y tetraciclina para inhibir el crecimiento bacteriano (Siles *et al.*, 2014). En este caso, las placas se incubaron durante 96 h a 28 y 55 °C respectivamente, para hongos mesófilos y termófilos.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC g⁻¹).

3.5.2 Identificación filogenética de los microorganismos aislados: extracción del ADN genómico, amplificación y secuenciación.

A partir de las placas de los recuentos y en función de la diversidad morfológica, se seleccionaron distintas colonias o morfotipos y se sembraron en medio TSA en el caso de las bacterias y en MEA o patata dextrosa agar (PDA; VWR Prolab Chemicals, Francia), en el caso de los hongos. Se seleccionaron los morfotipos dominantes y se aislaron e identificaron mediante amplificación de la región de ARNr específico para cada tipo de microorganismo, tal y como se describe en la sección de secuenciación. Para su

conservación a largo plazo, se preparó un cultivo en medio líquido para bacterias y cuadrados de 0.5 x 0.5 cm de medio con micelio de las placas Petri, en el caso de los hongos. Estos se dispusieron en criotubos con glicerol al 80 y 60%, respectivamente y conservados a -20 y -80 °C.

3.5.3 Identificación de las cepas bacterianas seleccionadas

La identificación de las cepas bacterianas se realizó mediante secuenciación del gen 16S ARNr (Fig. 3.5).

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy® de Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de un cultivo puro. El ADN purificado se diluyó en un volumen final de 50 µL de agua Milli-Q estéril y se almacenó a -20 °C. La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con la pareja de cebadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Para la mezcla de reacción se utilizaron 2 µL de tampón 10x de PCR Kit, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs, 8 mM), 0.2 µL Taq DNA polimerasa (5 U µL⁻¹) (Kit Horse-Power-Taq DNA polymerase) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. De cada cebador se utilizó 1 µL a una concentración de 10 µM. El volumen de cada reacción se completó con agua destilada y esterilizada (libre de ARN) hasta un volumen de 20 µL. La mezcla de reacción se amplificó en un termociclador Eppendorf Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con un programa que consistió en una etapa de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos con un fase de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, una fase de anillamiento a 56 °C durante 30 s y 1.40 min de extensión a 72 °C, finalmente un ciclo de 10 min a 72 °C.

Para la visualización del ADN, con los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tris acetato-EDTA (TAE) suplementado con 0.002% de GelRed 10000x (Biotium Inc., Hayward, CA, EEUU). Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron mediante el Kit de purificación Clean-Easy (Canvax Biotech, Córdoba, España).

Los productos de PCR se secuenciaron utilizando un analizador genético ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en el Instituto de Biomedicina y Parasitología López-Neyra (CSIC, Granada, España). Las secuencias se analizaron usando BLASTn, en el sitio web proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este análisis se realizó para la identificación de las cepas seleccionadas de la Pila I.

En la Pila II, por motivos de rentabilidad económica y temporal, la extracción de ADN, PCR y la secuenciación se realizó en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (España): Área de Análisis de Ácidos Nucleicos. Para la extracción de ADN se empleó el kit PrepMan Ultra (Applied Biosystems) y la amplificación se hizo con la pareja de cebadores 27F (5'–AGA GTTTGATCMTGGCTCAG–3') y 699R (5'–RGGGTTGCGCTCGTT–3') (Fig. 3.5) y la pareja de cebadores BA-RF (5'–GAC GATCATYTWGGAAACCG–3') y BA-RR (5'–GGNGTYTCRATYGGACACAT–3') (Ko *et al.*, 2003) utilizando un termociclador GeneAmp PCR sistema 2700 (Applied Biosystems). Cada reacción de 50 μ L se realizó utilizando el kit DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific) con 20 pmol de cada cebador y 1 μ L de ADN. La mezcla de la reacción se amplificó en un termociclador usando un programa de 35 ciclos que consistió en: 95 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y extensión durante 1 min a 72 °C. Finalmente, se mantuvo 10 min a 72 °C para la extensión.

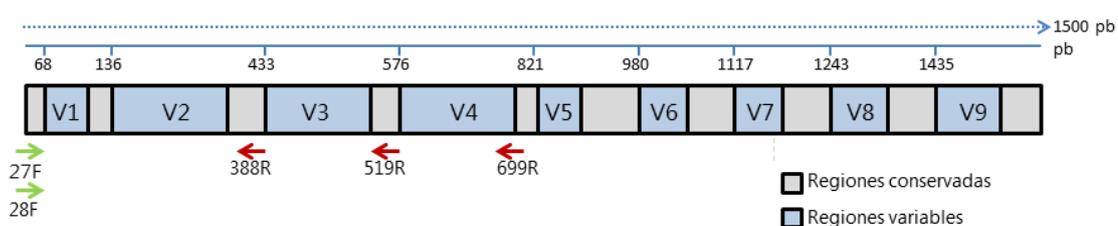


Figura 3.5. Esquema de las regiones del gen ARNr 16S de bacterias y localización de los cebadores.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante y secuenciados utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) en secuenciador automático capilar ABI 3130xl (Applied Biosystems).

3.5.3 Identificación de los hongos seleccionados

De forma similar a la identificación bacteriana, para la identificación filogenética de los aislados se siguieron dos procedimientos.

En el primero, realizado al inicio de este estudio, la extracción de ADN y la obtención del producto de PCR se realizó en nuestro laboratorio utilizando la secuenciación de la región intergénica (ITS) y el ARNr 28S (Fig. 3.6). A partir de una placa fresca de cada hongo incubado a 28 °C, se tomó entre 1-2 cm del micelio. Este se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se congeló a -80 °C durante la noche. El micelio congelado se utilizó para obtener el ADN genómico mediante el Kit Power Soil DNA Isolation, de MoBio™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se resuspendió en 50 mL de agua Milli-Q y almacenó a 4 °C. El fragmento de ADN se amplificó usando los cebadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman and Robnett, 1998); White *et al.*, 1990) un fragmento de aproximadamente 650 pb de la región D1/D2 del ARNr 28S (Fig. 3.6). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL, 2 µL de la mezcla 8 mM de dNTPs, 2 µL de tampón de PCR y 2 µL de MgCl₂ 25 mM (Canvax Biotech, Córdoba, España) y un volumen viable entre 1-5 µL de ADN molde en función de la concentración. A la mezcla de reacción también se añadió 1 µL de cada cebador a 10 µM y 0.2 µL de Horse-Power-Taq ADN polimerasa™ (5 U µL⁻¹) (Canvax Biotech). La amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando el siguiente protocolo: 1 ciclo a 94 °C durante 5 min, 30 ciclos a 95 °C durante 30 s, 59 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y un ciclo adicional a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) (agarosa LE SeakemR Cambrex Bio Science). Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación PCR Clean-Easy™ (Canvax Biotech) y se secuenciaron utilizando los servicios del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. Parte las cepas fúngicas aisladas fueron identificadas en el Área de Análisis de Ácidos Nucleicos Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (España), utilizando las parejas de cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) correspondientes a la región 5.8s con un tamaño de 550 pb

correspondiente con las parejas de cebadores. También se utilizó la pareja de cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') de la región del ARNr 28S para las levaduras (Fig. 3.6).

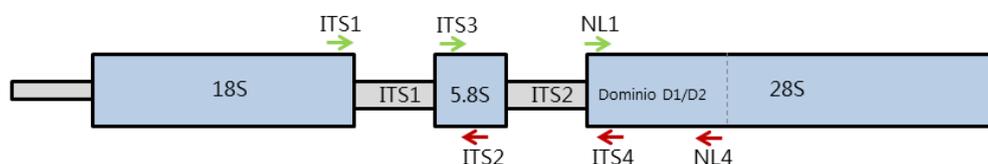


Figura 3.6 Esquema del ARN fúngico y los cebadores correspondientes en cada región.

Una vez obtenidas las secuencias se realizó un solapamiento para formar una secuencia consensuada. Las secuencias se editaron con el software Chromas Lite y fueron contrastadas con la base de datos BLASTn del NCBI. El alineamiento de las secuencias para la construcción del árbol filogenético se hizo usando ClustalW. El árbol filogenético se construyó mediante el método de Neighbor-Joining usando el test Maximum Likelihood Tree y las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método p -distance (Nei y Kumar, 2000) mediante el software Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3.6 Caracterización de la comunidad microbiana mediante técnicas independientes de cultivo.

La secuenciación de las comunidades microbianas implicadas en el proceso de compostaje se realizó utilizando la plataforma Illumina MiSeq en el Laboratorio de Investigación y Ensayo Lubbock (RTL Lubbock, Texas, EE.UU).

3.6.1 Extracción de ADN total y secuenciación de las comunidades bacterianas y fúngicas

La extracción de ADN total se realizó a partir de 10 g de muestra que fueron previamente concentradas. Para la concentración se añadieron 25 mL de solución salina estéril, se colocó en un baño de ultrasonidos durante 10 min y se centrifugó a 800 rpm. Esta operación se repitió dos veces. El sobrenadante clarificado se centrifugó a 10000 rpm para obtener un pellet. Para la extracción de ADN se utilizó el Kit FastDNA® Spin for soil (MP Biomedicals, Solon, OH) según las instrucciones del fabricante. El ADN se amplificó mediante PCR usando el kit (Canvax Biotech, Córdoba, España), siguiendo las

instrucciones del fabricante. El ADN se detectó por electroforesis en gel (1% de agarosa) y se cuantificó usando Nanodrop™. Se hizo la elución del ADN purificado en un volumen final de 20 µL en agua Milli-Q estéril y se almacenó a -20 °C. Para análisis de las comunidades bacterianas mediante secuenciación masiva se usaron los cebadores del gen ARNr16S bacteriano 28F (5'–GAGTTTGATCNTGGCTCAG–3') y 519R (5'–GTNTTACNGCGGCKGCTG–3') (Fan *et al.*, 2012) para la Pila I. En la Pila II, 28F (5'–GAGTTTGATCNTGGCTCAG–3')y 388R (5'–TGCTGCCTCCCGTAGGAGT–3') (Celano *et al.*, 2016) (Fig. 3.5). Para el análisis de las comunidades fúngicas se emplearon los cebadores ITS3-ITS4 (White *et al.*, 1990 (Fig. 3.6).

3.6.2 Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación y el análisis de los datos para la comunidad bacteriana se realizó por el equipo de Research and Testing Laboratory (RTL Genomics , Lubbock, TX. USA) de acuerdo con su metodología (Research and Testing Laboratory, 2014). Brevemente, las secuencias obtenidas en formato FASTAQ fueron emparejadas siguiendo la combinación de secuencias de extremos emparejados PEAR Illumina (Zhang *et al.*, 2014a) para obtener un único archivo en formato FASTAQ. El archivo FASTAQ fue separado en el archivo FASTA y el archivo de calidad (qual). Las secuencias se recortaron y la eliminación de ruido se realizó utilizando el algoritmo USEARCH (Edgar, 2010). La comprobación de quimeras se llevó a cabo utilizando el software de detección de quimeras UCHIME ejecutado en el modo *de novo* (Edgar *et al.*, 2011). Las secuencias resultantes se agruparon en unidades taxonómicas operacionesles (OTUs) representativos, utilizando el algoritmo UPARSE (Edgar, 2013). La afiliación taxonómica se asignó a cada OTU utilizando el clasificador RDP (Wang *et al.*, 2007) con una confianza mínima del 80%. Se calcularon las curvas de rarefacción y los índices de diversidad alfa utilizando el software libre PAST (Hammer *et al.*, 2001) y el índice de Good (Good, 1953).

Los datos obtenidos de la secuenciación de la Pila II, se analizaron durante la estancia realizada en el Departamento de Ecología del Berkeley Laboratory (Lawrence Berkeley National Laboratory, California, USA) a partir de los datos brutos obtenidos de

la secuenciación con Illumina MiSeq en el RTL Genomic (Lubbock, Texas, USA). La calidad de la secuenciación se examinó utilizando el programa FastaQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Para el tratamiento de las secuencias se utilizó el software QIIME 1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso *et al.*, 2010). Brevemente se hizo el solapamiento de las dos lecturas para cada muestra. La asignación taxónomica se hizo utilizando el algoritmo USEARCH en el modo *open reference*. La detección y eliminación de quimeras se incluyó en este paso al igual que la eliminación de las secuencias presentes una sola vez (singletons). La base de datos utilizada para la asignación de OTUs y análisis de comunidades bacterianas fue Greengenes para bacterias (DeSantis *et al.*, 2006), y UNITE (Kõljalg *et al.*, 2005) para hongos. A partir de los datos de OTUs y usando el mismo software se hizo en análisis de comunidades para el análisis de la α y β - diversidad. En el caso de la comunidad bacteriana se hizo con el método de UniFrac y para las comunidades fúngicas se usó el método de Bray-Curtis. Los datos obtenidos en el análisis de QIIME se analizaron con la herramienta Source Tracker mediante el software de R para ver la evolución del porcentaje de señal procedente de las comunidades presentes en ambos materiales de partida (lodo y estructurante) y a lo largo del proceso. El análisis se hizo en función de la presencia y ausencia de las poblaciones presentes (o ausentes) únicamente en el material a compostar y la evolución de su señal a lo largo del proceso de compostaje. Los comandos utilizados se detallan en el Anexo II.

3.6.3 Estudio de las comunidades víricas

- *Concentración de las partículas virales en fase líquida*

Para la concentración y purificación de la partículas virales, se resuspendieron 80 g de muestra en 200 mL de tampón fosfato salino 1x (PBS; pH: 7.4), se homogenizó y la mezcla se llevó a un baño de ultrasonidos durante 10 min. A continuación las muestras se centrifugaron durante 15 min a 4 °C. Este paso se repitió 3 veces para obtener un volumen representativo de sobrenadante. El sobrenadante se filtró en primer lugar a través de papel de filtro y en segundo lugar a través de membranas de filtración de 0.45 μm de tamaño de poro (Milipore®). Al volumen filtrado se añadió polietilenglicol (PEG 8000) al 8% p/v y 0.3 M de NaCl, se homogeneizó e incubó durante 12 h a 4 °C. A

continuación se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de PBS. La suspensión obtenida se filtró a través de membranas de filtración de 0.22. µm. (Milipore®). El filtrado recogido se concentró utilizando Amicon® Ultra – 15 Centrifugal (Merck, Ireland) por centrifugación durante 10 min a 5000 rpm y 4 °C. La suspensión concentrada fue recogida en tubos de 1.5 mL y congelada a -20 °C.

- *Microscopía electrónica de transmisión para la visualización de virus*

Para confirmar la presencia de virus en las muestras, tras la concentración con PEG, estas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Para la preparación de las muestras, 1 mL de la suspensión concentrada se dispuso sobre las rejillas de film de carbón (300H Cu CF) durante 5 min, se lavó con agua Milli-Q dos veces y se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2%. Posteriormente se observaron utilizando un microscopio TEM Libra 120 Plus de Zeiss a 120KV.

- *Extracción de ácidos nucleicos de las partículas virales y síntesis de ADNc*

La extracción de ADN se hizo con el Kit QIAamp® UltraSens® de QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Protocol: Purification of Viral RNA and DNA). La extracción de ARN se hizo con el kit Trizol® kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Inmediatamente después de la extracción se procedió a síntesis de ADN complementario (ADNc), utilizando el kit cDNA Synthesis Kit de Roche, 11117831001) y el cebador (primer "random", Roche, 11034731001) en un termociclador Eppendorf Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para descartar la presencia de ADN bacteriano se realizó una PCR del ARNr 16S utilizando un control positivo y siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5.3. La mezcla del ADN y ADNc obtenida se envió a secuenciar. El análisis de las poblaciones víricas se ha realizado mediante dos técnicas de secuenciación, la primera de ellas se realizó en el servicio de secuenciación RTL Genomics (Lubbock, Texas, USA) mediante Illumina HiSeq y la segunda se realizó en el

Instituto de Microbiología y Parasitología de Liubliana (Eslovenia) mediante Ion Torrent™ Personal Genome Machine® (PGM) de Thermo Fisher Scientific.

- *Análisis estadístico multivariante*

Para el análisis estadístico se utilizó el software v6 (Plymouth, UK). Los datos se transformaron y representaron utilizando el escalamiento no multidimensional (NMDS) para la representación de la abundancia a nivel de orden de las comunidades bacterianas y fúngicas. Estos datos se transformaron previamente a la cuarta raíz y la matriz de similitud fue construida en base al algoritmo de Bray-Curtis. Sobre el NMDS se representaron las correlaciones como vectores de los parámetros físico-químicos. Para seleccionar los parámetros físico-químicos se transformaron previamente a la cuarta raíz y normalizaron, generando la matriz de similitud en base a la distancia euclídea. Las correlaciones entre parámetros físico-químicos se evaluaron mediante el análisis Draftsman, para seleccionar un único representante en aquellos parámetros con una correlación ≥ 0.90 . Los parámetros más influyentes sobre la distribución de las muestras en el NMDS se seleccionaron en base al análisis BEST por el método BIOENV (Clarke y Ainsworth, 1993). Los datos de las actividades enzimáticas se estandarizaron y transformaron a la cuarta raíz. Los parámetros físico-químicos y las actividades enzimáticas se representaron en base al coeficiente de correlación de Spearman sobre el NMDS, mostrando la distribución de las muestras con el incremento direccional y la longitud de los vectores. El nivel de estrés del NMDS se calculó automáticamente como una medida de fuerza aplicada con el software para ordenar los datos multidimensionales en un plano bidimensional (Clarke y Warwick, 1994).

3.7 Cribado cualitativo de la producción enzimática extracelular de los aislados durante el proceso de compostaje

La caracterización enzimática de las cepas bacterianas y fúngicas se hizo en los aislados de la Pila II. Se seleccionaron distintas actividades enzimáticas por su interés industrial como la actividad amilasa, amonificante, celulasa, hemicelulasa, fosfatasa soluble, lipasa, pectinasa, proteasa, lacasa, peroxidasa, polifenol oxidasa y tirosinasa. La caracterización cualitativa de estas enzimas se hizo siguiendo los métodos expuestos en la tabla 3.2 y la determinación de enzimas oxidativas (lacasa, tirosinasa, peroxidasa y

polifenol oxidasa) siguiendo el método de Gramss y colaboradores (1998). Estos métodos consistieron en la utilización del sustrato específico para cada enzima, adicionado al medio de cultivo (líquido o sólido) y la observación del cambio de color. Las actividades en medio sólido se determinaron utilizando TSA para bacterias y PDA para hongos, adicionado con el sustrato correspondiente. Para las actividades en medio líquido (amonificante) se utilizó tripticasa soja caldo (TSB, Oxoid™) para bacterias y caldo de patata (PDA, Sigma-Aldrich, Alemania) para los hongos. Para los ensayos, tanto en medio líquido como sólido, se inocularon 30 µL de un cultivo de 24 h a 30 °C para bacterias y porciones de micelio de aproximadamente 0.5 x 0.5 mm de cultivos de 96 h a 28 °C en el caso de los hongos.

Para el método de Gramms y colaboradores (1998), primero se cultivó el aislado en MEA y posteriormente se adicionó el reactivo correspondiente. La temperatura para todas las enzimas fue a 30 °C y 28 °C para bacterias y hongos, respectivamente y cada determinación se hizo por triplicado. En la tabla 3.2 se muestra de manera resumida los sustratos utilizados, el tiempo de incubación y el revelado de resultados para cada actividad determinada.

Tabla 3.2. Metodología empleada para la determinación cualitativa extracelular.

Actividad	Sustrato	Días de incubación	Revelado y resultados positivos
Proteasa (Strauss <i>et al.</i> , 2001)	TSA + 1% de caseinato de Na	3	Halo transparente alrededor de la colonia
Amilasa (Hankin y Anagnostakis, 1975)	TSA + 1% de almidón	3	Decoloración alrededor de la colonia tras la adición de 1 mL de Lugol.
Fosfato soluble (Nautiyal, 1999)	2.5% de fosfato tricalcico	3	Halo transparente alrededor de la colonia.
Lipasa (Leuschner <i>et al.</i> , 1997)	TSA + 1% de tributirina	5	Halo transparente alrededor de la colonia.
Amonificante (Pochon y Tardieux, 1962)	TSB + 0.02% de asparagina.	15	Formación de un precipitado naranja tras la adición de 1 mL de reactivo Neßler.
Tirosinasa (Gramss <i>et al.</i> , 1998)	Se adicionaron unas gotas de una solución 0.1 M de β -cresol (disuelto en etanol).	1	Aparición de una coloración amarillo-rojiza.
Pectinasa (Cotty <i>et al.</i> , 1990)	TSA + 0.5% de pectina	5	Aparición de un halo rosa alrededor de la colonia después de la adición de 1-2 mL de rojo rutenio al 0.05%. incubado 1 h a temperatura ambiente y después de lavar con H ₂ O
Hemicelulasa (Janshekar <i>et al.</i> , 1982)	TSA + 0.5% de xilano	5	Halo transparente alrededor de la colonia
Celulasa (Kauri y Kushner, 1988)	TSA + 0.5% de celulosa + 0.0005 % nigrosina	7-10	Decoloración alrededor de la colonia
Lacasa (Gramss <i>et al.</i> , 1998)	Se adicionaron gotas de una solución 0.1 M 1-naftol (disuelto en etanol).	1	Aparición de una coloración azul-violeta
Peroxidasa (Gramss <i>et al.</i> , 1998)	Se adicionaron gotas de pirogalol al 0.5% en agua y seguidamente peróxido de hidrógeno.	1	Aparición de una coloración marrón
Polifenol oxidasa (Gramss <i>et al.</i> , 1998)	Se adicionaron gotas de pirogalol al 0.5% en agua	1	Aparición de una coloración marrón

3.8.1 Determinación cuantitativa de la actividad proteasa en cepas bacterianas seleccionadas

Para la cuantificación de la actividad proteasa se utilizó el método propuesto por Cupp-Enyard (2008) que consiste en que la presencia de proteasas produce la liberación de tirosina, que reacciona con el reactivo Folin-Ciacoulteau, adquiriendo una coloración azul cuando se usa la caseína como sustrato. El medio de cultivo empleado en la fase de incubación es una modificación del empleado por Sharma y colaboradores (2015).

Se prepararon preinóculos en medio líquido TSB de cada una las cepas bacterianas objeto de estudio, previamente incubadas durante 24 h a 30 °C. Un volumen de 0.5 mL de cada preinóculo se inoculó en el medio específico y se incubó a 30, 37 y 50 °C durante 72 h. Transcurrido dicho tiempo, los cultivos se centrifugaron a 10000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación espectrofotométrica de la enzima.

Se añadió 1 mL del sobrenadante a 5 mL de una solución de caseína, previamente incubada en un baño a 37 °C durante 5 min. Seguidamente se añadieron 5 mL de TCA (110 mM) a cada tubo y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Las muestras se filtraron y a continuación se añadieron 5 mL de Na₂CO₃ (10 mM) y 1 mL de reactivo Folin-Ciacoulteau (0.5 M) y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 UV/VIS usando a una longitud de onda a 660 nm. Los datos se extrapolaron a partir de una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de tirosina siguiendo el mismo procedimiento.

4. Resultados y discusión

4.1 Efecto de la cubierta semipermeable sobre las propiedades físico-químicas y biológicas durante el proceso de compostaje de la Pila I

4.1.1 Monitorización de la temperatura

La figura 4.1 muestra la evolución de la temperatura a lo largo del proceso de compostaje en la Pila I, en la que, tal y como se describe en materiales y métodos, la duración bajo cubierta semipermeable fue de 60 días.

Durante la fase bajo cubierta, el rango predominante de temperatura osciló entre 60 y 70 °C. A partir de los 50 días, se observó un descenso de la temperatura, alcanzando los valores mínimos de todo el proceso, con una temperatura de 25 °C.

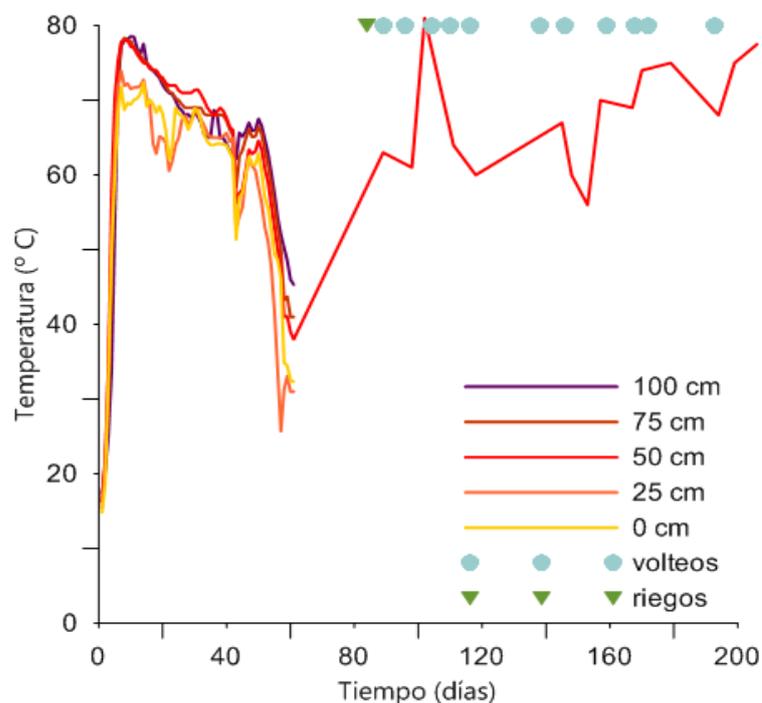


Figura 4.1. Evolución de la temperatura a lo largo del proceso de compostaje de la Pila I medido con una sonda a 0 cm, 25 cm, 75 cm y 100 cm de profundidad en la Pila I.

Durante la fase de maduración (a partir de 60 días), cuando se retiró la cubierta de la pila, hubo un incremento de la temperatura, a pesar del riego al inicio de dicha fase y de los volteos periódicos que se realizaron. En general, las temperaturas alcanzadas durante la etapa cubierta y la etapa de maduración fueron similares, con valores superiores a 60 °C, de manera que la evolución de la temperatura muestra un

predominio de temperaturas termófilas, con pequeñas diferencias en función del perfil de profundidad (0, 25, 50, 75 y 100 cm).

Estos rangos de temperatura contrastan con los alcanzados en sistemas de pilas abiertas y aireadas con volteo. En los estudios llevados a cabo por Chen y colaboradores (2014), la fase termófila no superó los 55 °C y en el compostaje de lodos llevados a cabo por Nikaeen y colaboradores (2015), la fase termófila sólo alcanzó los 60 °C, tanto en pilas estáticas aireadas como en pilas volteadas. A diferencia de los sistemas convencionales abiertos, en el sistema utilizado, la cubierta semipermeable y el sistema de aireación vertical desde el suelo mantuvo altas temperaturas durante largos períodos de tiempo, lo que podría favorecer la sanitización de los residuos, ya que un rango entre 50-70 °C es considerado una temperatura óptima para la desinfección y eliminación de microorganismos patógenos (Wéry *et al.*, 2008). Temperaturas similares se han observado en procesos de compostaje bajo cubierta semipermeable con distintos residuos, como los residuos alimentarios y el compostaje de lodos, utilizando plásticos como estructurante (Maliki y Lai, 2011; Zhou *et al.*, 2014).

4.1.2 Evolución de los parámetros físico-químicos

Las características físico-químicas de los materiales de partida empleados en este estudio y de las muestras tomadas a distintos tiempos del proceso de compostaje se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1. Propiedades físico-químicas del material de partida (lodo y estructurante vegetal) y de las muestras a lo largo del proceso de compostaje de la Pila I. CE: conductividad eléctrica; %H: porcentaje de humedad; %COx: porcentaje de carbono orgánico oxidable; %MO: porcentaje de materia orgánica; %SV: porcentaje de sólidos volátiles; %NTK: porcentaje de nitrógeno Kjeldahl total; C/N: relación carbono-nitrógeno; %P₂O₅: porcentaje de fósforo; %CT: porcentaje de carbono total; %CI: porcentaje de carbono inorgánico. Los valores representan el promedio de 3 réplicas ± el error absoluto.

Muestra/ Parámetro	Lodo	Estructuran te	1 día	5 días	15 días	40 días	60 días	120 días	190 días
CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1817	1380	863	424	537	730	1088	1010	1020
pH	6.62	6.32	6.62	7.53	7.52	7.60	7.48	7.55	8.04
% H	79.6	17.3	58.8	52.4	50.7	61.5	32.9	31.2	26.4
% COx	32±2	25±1	26±1	33±2	40±1	25±2	25±1	18±1	7±1
% MO	55±3	43±2	45±2	57±3	69±2	43±3	43±2	31±2	11±1
% SV	61±4	59±2	54±3	50±3	41±2	41±2	41±1	32±1	28±3
% NTK	5.45	1.23	2.6	1.9	1.7	1.6	1.8	1.4	1.6
C/N	6.5	27.8	12.0	15.3	14.0	14.9	13.2	13.3	4.0
% P ₂ O ₅	4.40	0.1	1.5	0.9	1.9	1.3	1.4	1.3	1.4
% CT	2.66	1.04	0.85	0.80	0.74	0.64	1.59	1.35	0.75
% CI	0.03	0.05	0.04	0.03	0.02	0.05	0.04	0.12	0.05
% COT	2.63	0.99	0.81	0.77	0.72	0.59	1.55	1.23	0.70

El lodo y el estructurante mostraron valores de conductividad de 1817 y 1380 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente y valores similares de pH (6.62 y 6.32, respectivamente). En la mezcla inicial hubo una reducción notable de la conductividad hasta los 863 $\mu\text{S cm}^{-1}$, mientras que el pH se mantuvo con valores similares al pH del lodo.

El lodo mostró un alto contenido de humedad (en torno al 80%) y su contenido en sólidos volátiles (SV) fue del 62%. Asimismo, presentó un contenido elevado en nitrógeno-Kjeldahl (% NTK), lo que explicaría que la relación C/N tuviera valores de 6.5. El porcentaje de P_2O_5 fue elevado (4.4%), debido a que el lodo tiende a combinarse con la fracción sólida durante el tratamiento de aguas residuales, lo que explica el elevado contenido detectado. Así, según Cieřlik y Konieczka (2017), en el tratamiento de aguas, el 90% del fósforo quedaría retenido en los lodos activos. Con respecto a los valores de carbono total (%CT), la mayor parte correspondió a carbono orgánico (%COT). El alto contenido de materia orgánica del lodo puede explicarse por su composición, constituida por materia orgánica natural y gran cantidad de detergentes de uso doméstico que se acumulan en los mismos.

El estructurante vegetal, contituido por restos vegetales de poda, presentó un porcentaje de humedad mucho menor. Esta característica constituye un factor importante, ya que el material estructurante permitió reducir el alto porcentaje de humedad del lodo, como se observó en la mezcla inicial (muestra día 1). La mayor relación C/N del estructurante vegetal (27.8) influyó en la relación C/N de la mezcla inicial. El contenido en P fue muy bajo y el COT fue mayoritariamente orgánico, al estar constituido principalmente por material lignocelulósico.

En cuanto a la evolución de estos parámetros durante el proceso de compostaje, hubo un cambio significativo en los valores de CE, disminuyendo hasta la mitad de su valor inicial a los 5 días, con un valor de 424 $\mu\text{S cm}^{-1}$, valor que comenzó a incrementarse a partir del tiempo 40, hasta que a los 60 días se situó en valores de 1000 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Respecto al %H, la mezcla inicial tuvo un 58.8%, valor óptimo de acuerdo con Gajalakshmi y Abbasi (2008) el cual debe estar entre el 45-60%. Durante la fase de

maduración, la humedad descendió hasta alrededor del 30%, obteniendo un valor del 26.4% al final del proceso.

Los parámetros relacionados con el contenido de carbono, como %MO y el %SV aumentaron durante la fase bajo cubierta y disminuyeron en la fase de maduración. Los SV descendieron hasta un 24% en las dos primeras semanas, pero hacia el final de la fase de compostaje se incrementó dicho porcentaje y se alcanzaron valores del 41%. El %CT alcanzó su valores máximos en la fase de maduración aunque el valor final disminuyó hasta un 0.75%, constituido prácticamente por carbono orgánico.

La relación C/N alcanzó un valor máximo de 14.9 a los 30 días y decayó a 4 al final del proceso, debido posiblemente a un descenso más acentuado del %COx. El valor inicial del ratio C/N de la mezcla estarían próximos a los valores propuestos por Roca y colaboradores (2009) quiénes proponen valores entre 15 y 20 para este ratio, como condiciones óptimas para favorecer la actividad microbiana. Estos resultados concuerdan con los valores de NTK, que disminuyeron notablemente en los primeros 5 días y a partir de aquí se mantuvo prácticamente constante. La disminución podría ser debida a la volatilización parcial del amoníaco (NH₃) por el aumento de la temperatura y por el ratio inicial de C/N, que podría haber favorecido dicha pérdida. No hay un consenso respecto a los valores adecuados para este ratio o a su uso como indicador de la madurez del compost. Sin embargo, algunos autores consideran que una disminución del C/N podría ser indicativo de la degradación de la materia orgánica, considerando valores por debajo de 12, indicadores de un grado avanzado de estabilización de la materia orgánica (Bernai *et al.*, 1998).

4.1.3 Metales pesados

Debido a la procedencia de los lodos empleados y a la carencia de suministro de residuos industriales a esta EDAR, el contenido inicial de metales pesados del lodo se situó por debajo de los límites establecidos por la ley, adecuado para revalorizarlo mediante un proceso de compostaje (Tabla 4.2).

Los datos correspondientes a la concentración de los metales pesados detectados, tanto en los materiales de partida como durante el proceso de compostaje, se recogen en la Tabla 4.2. En el lodo de partida se detectaron concentraciones elevadas de Cu, Zn, Ni y Pb (240, 612, 48 y 78 ppm respectivamente).

Tabla 4.2. Contenido en metales pesados en las muestras durante el proceso de compostaje de la Pila I.

Concentración(ppm)	Cu	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
Lodo	240	ND	59	48	78	612
Estructurante	37	ND	64	49	56	126
1 día	167	ND	66	50	56	406
5 días	117	ND	93	61	50	273
15 días	138	1.5	59	49	49	358
30 días	99	1	89	64	50	298
60 días	149	0.8	90	59	48	307
120 días	70	1.5	41	30	31	169
190 días	139	ND	51	68	39	379
Compost Clase A*	70	0,7	70	25	45	200
Compost Clase B*	300	2	250	90	150	500
Compost Clase C*	400	3	300	150	200	1000

ND: no detectado.*Clasificación del RD 506/2013

La mezcla inicial contribuyó a diluir las concentraciones de estos elementos al inicio y a lo largo del proceso, de manera que, en líneas generales, las concentraciones de todos los metales disminuyeron durante el proceso de compostaje, salvo el Cu, Ni y Zn. Durante el compostaje disminuyó el contenido en metales, obteniendo una categoría a compost de Clase B al final del proceso.

4.1.4 Determinación de microorganismos patógenos

En este análisis se estudiaron dos patógenos indicadores de contaminación fecal incluidos en la normativa: *E. coli* y *Salmonella* (Tabla 4.3).

En el caso de *E. coli*, la concentración en el lodo alcanzó valores por encima de 1000 UFC g⁻¹ y se detectó la presencia de *Salmonella*. En el lodo también se detectó *E. coli* por encima de 1000 UFC g⁻¹ y la ausencia de *Salmonella*.

Tabla 4.3. Determinación de los microorganismos patógenos en la Pila I.

Muestra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.
Lodo	>1100	Presencia/25 g
Estructurante	>1100	Ausencia/25 g
1 día	>1100	Presencia/25 g
5 días	460	Ausencia/25 g
15 días	460	Ausencia/25 g
30 días	<3	Ausencia/25 g
60 días	20	Ausencia/25 g
120 días	<3	Ausencia/25 g
190 días	<3	Ausencia/25 g
Valores del RD 506/2013	<1000 según número más probable (NMP)	Ausencia/25 g

En cuanto a la evolución de estos dos indicadores fecales a lo largo del proceso, *E. coli* prácticamente desapareció a partir de los 30 días de compostaje (3 UFC g^{-1}) y *Salmonella* lo hizo en los 5 primeros días. Esto indicaría que la temperatura alcanzada fue suficiente para desinfectar el material compostable.

4.1.5 Enumeración de la microbiota cultivable

En la tabla 4.4 se muestra la enumeración de bacterias y hongos en los materiales de partida. En ambos materiales se observa la presencia de microorganismos mesófilos (hongos y bacterias) con valores por encima de 8 Log UFC g^{-1} . Sin embargo, los microorganismos termófilos sólo se detectaron en el estructurante vegetal.

Tabla 4.4. Enumeración de la microbiota bacteriana y fúngica en el material a compostar de la Pila I (Log UFC g^{-1}). El error se estimó con la desviación estándar de tres repeticiones.

Log UFC g^{-1}	Lodo	Agente estructurante
Bacterias mesófilas	8.4 ± 0.2	9.2 ± 0.2
Bacterias termófilas	ND	6.9 ± 0.7
Hongos mesófilos	8.2 ± 0.3	8.2 ± 0.3
Hongos termófilos	ND	6.8 ± 0.9

ND: no detectado.

En la figura 4.2 se muestra la evolución de la microbiota bacteriana durante el proceso de compostaje, diferenciando entre bacterias mesófilas y termófilas. La

población bacteriana mostró unos valores iniciales más altos al inicio del proceso y se mantuvo ligeramente más elevada en la fase bajo cubierta que en la fase de maduración. Además, las bacterias mesófilas mostraron una concentración mayor que las termófilas, a pesar de las altas temperaturas mantenidas durante todo el proceso.

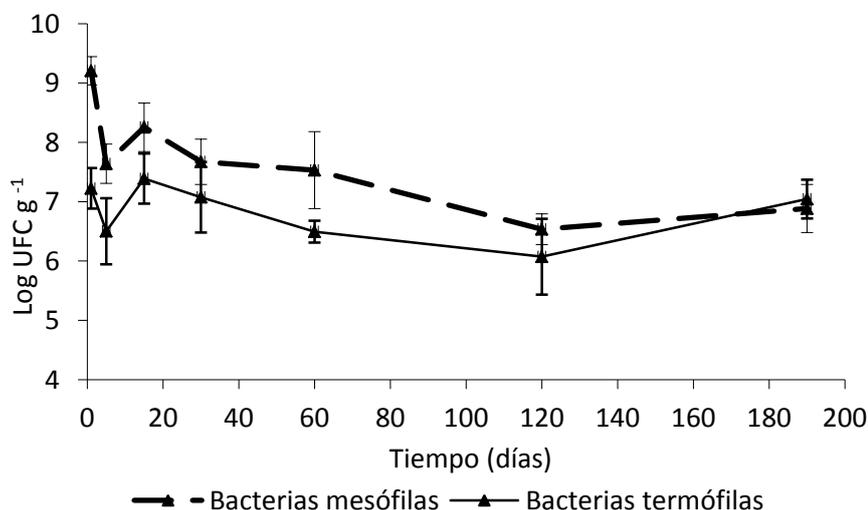


Figura 4.2. Evolución de la microbiota bacteriana durante el proceso de compostaje de la Pila I expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

En el caso de la microbiota fúngica (Fig. 4.3), los hongos mesófilos mostraron un tiempo de colonización más lento que los termófilos, pero alcanzaron poblaciones mayores a los 15 días. A partir de dicho tiempo, ambas poblaciones decrecieron hasta el final de la fase bajo cubierta (60 días), alcanzando valores cercanos a 6.5 Log UFC g⁻¹. Durante la fase de maduración, tanto la población mesófila como termófila no mostraron diferencias significativas.

La evolución de la microbiota muestra que, tanto las poblaciones de bacterias como las de hongos mesófilos, alcanzaron su máximo al comienzo del proceso. Este hecho podría deberse a que la mezcla inicial está compuesta por tres partes de estructurante vegetal y una de lodo, con lo que parte de estos microorganismos provendría fundamentalmente del agente estructurante. Además, al inicio del proceso predominan las condiciones mesófilas, condiciones óptimas para el crecimiento de esta población.

Después de los 15 días, la población mesófila decreció, debido fundamentalmente al aumento de la temperatura de la pila, cercano a los 70 °C. En el caso de microorganismos termófilos, el incremento de la temperatura al final del proceso favoreció el crecimiento de los mismos.

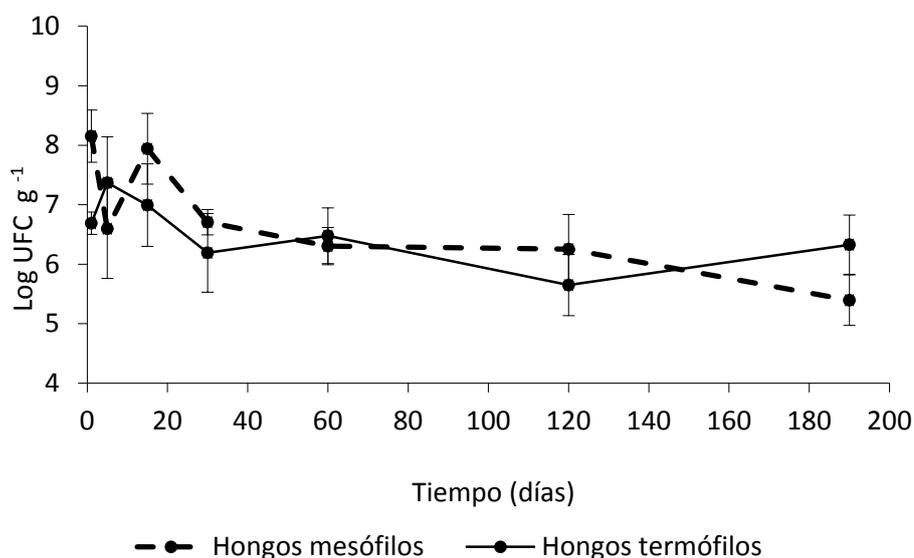


Figura 4.3. Evolución de la microbiota fúngica durante el proceso de compostaje de la pila I expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

4.1.6 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

A partir de las placas para el recuento de la microbiota cultivable se llevó a cabo la selección de cepas bacterianas, atendiendo a su diversidad morfológica, para su posterior identificación. En la tabla 4.5 se detalla la información relativa a la procedencia de cada uno de los morfotipos aislados, así como los resultados obtenidos tras su identificación mediante la secuenciación del gen del ARNr 16S, y la similitud de las secuencias con las especies conocidas más cercanas en la base de datos NCBI.

Tabla 4.5. Bacterias aisladas e identificadas en el material de partida y las distintas muestras durante el proceso de compostaje de la Pila I. Se muestra la procedencia de los aislados identificados y su similitud (porcentaje de identidad) con la base de datos del NCBI (número de acceso).

Muestra-tiempo de aislamiento	Número de aislado	Nombre	Porcentaje de identidad(%)	Nº de acceso
Estructurante	BP1B14	<i>Psychrobacter</i> sp.	99	KU644487
1 día	C1P1M39	<i>Arthrobacter</i> sp.	100	CP012171
	C1P1M40	<i>Brevibacterium iodinum</i>	99	KF444388
	C1P1M41	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100	KT779213
	C1P1M42	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	GQ246707
	C1P1M43	<i>Bacillus pumilus</i>	100	KX027352
	C1P1M44	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	100	KT020951
	C1P1M48	<i>Brevibacterium iodinum</i>	99	KF444388
	C1P1T22	<i>Geobacillus thermodesnitrificans</i>	100	AB210956
	C1P1T24	<i>Geobacillus thermodesnitrificans</i>	99	AB210956
	C1P1T30	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	98	AB210956
C1P1T31	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	99	KP010231	
5 días	C2P1T33	<i>Solibacillus silvestris</i>	100	LN870317
	C2P1T34	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99	KX146480
	C2P1T35	<i>Bacillus altitudinis</i>	100	KT986125
	C2P1T36	<i>Bacillus simplex</i>	100	LT547805
15 días	C3P1M54	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	100	KF228924
	C3P1M56	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100	KT270573
	C3P1M57	<i>Brevibacterium siliguriense</i>	98	NR_115086
30 días	C4P1M65	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX350026
	C4P1M66	<i>Bacillus</i> sp.	99	EF621528
	C4P1M68	<i>Bacillus pumilus</i>	100	KX027352
	C4P1M69	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX350026
	C4P1M71	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX350026
60 días	C5P1M73	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100	KX146480
	C5P1M76	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100	KT270573
	C1P1M77	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KT382228
	C5P1M78	<i>Acinetobacter towneri</i>	97	KM070563
	C5P1M79	<i>Proteus vulgaris</i>	100	JX971531
120 días	C6P1T84	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	100	KF305116

Cabe destacar que durante todo el proceso se aislaron especies pertenecientes al género *Bacillus*. La mayor diversidad de los aislados se observó al inicio del proceso, en el día 1, identificándose cepas pertenecientes a *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium iodinum*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter* sp., *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas xanthomarina* y *Geobacillus thermodesnitrificans*.

Avanzado el proceso, entre el tiempo 5 y 15, hubo mayor predominio del género *Bacillus* y se identificaron especies como *B. aryabhatai*, *B. altitudinis*, *B. simplex*, *Solibacillus silvestris* y *Acinetobacter lwoffii*, *Staphylococcus sciuri* y *Brevibacterium siliguriense*. A los 30 días, todos los identificados pertenecieron al género *Bacillus*. En la

fase de maduración, cuando la temperatura disminuyó a 40 °C, además de *Bacillus* y *S. sciuri*, aparecieron *Proteus vulgaris* y *Acinetobacter towneri*.

Los análisis revelan que los aislados más frecuentes durante todo el proceso de compostaje pertenecieron a tres órdenes principales: *Bacillales* (67%), *Pseudomonadales* (20%) y *Actinomycetales* (13%) (Fig. 4.4).

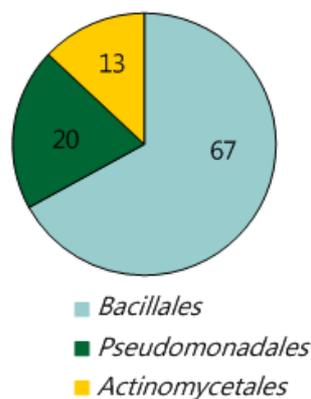


Figura 4.4. Porcentajes de abundancia relativa a nivel de orden de los aislados bacterianos obtenidos a lo largo del proceso de compostaje en la Pila I mediante identificación con el gen del ARNr 16S.

La distribución taxonómica de las cepas bacterianas identificadas en función de su homología con las secuencias del gen del ARNr 16S se muestran en el árbol filogenético representado en la figura 4.5.

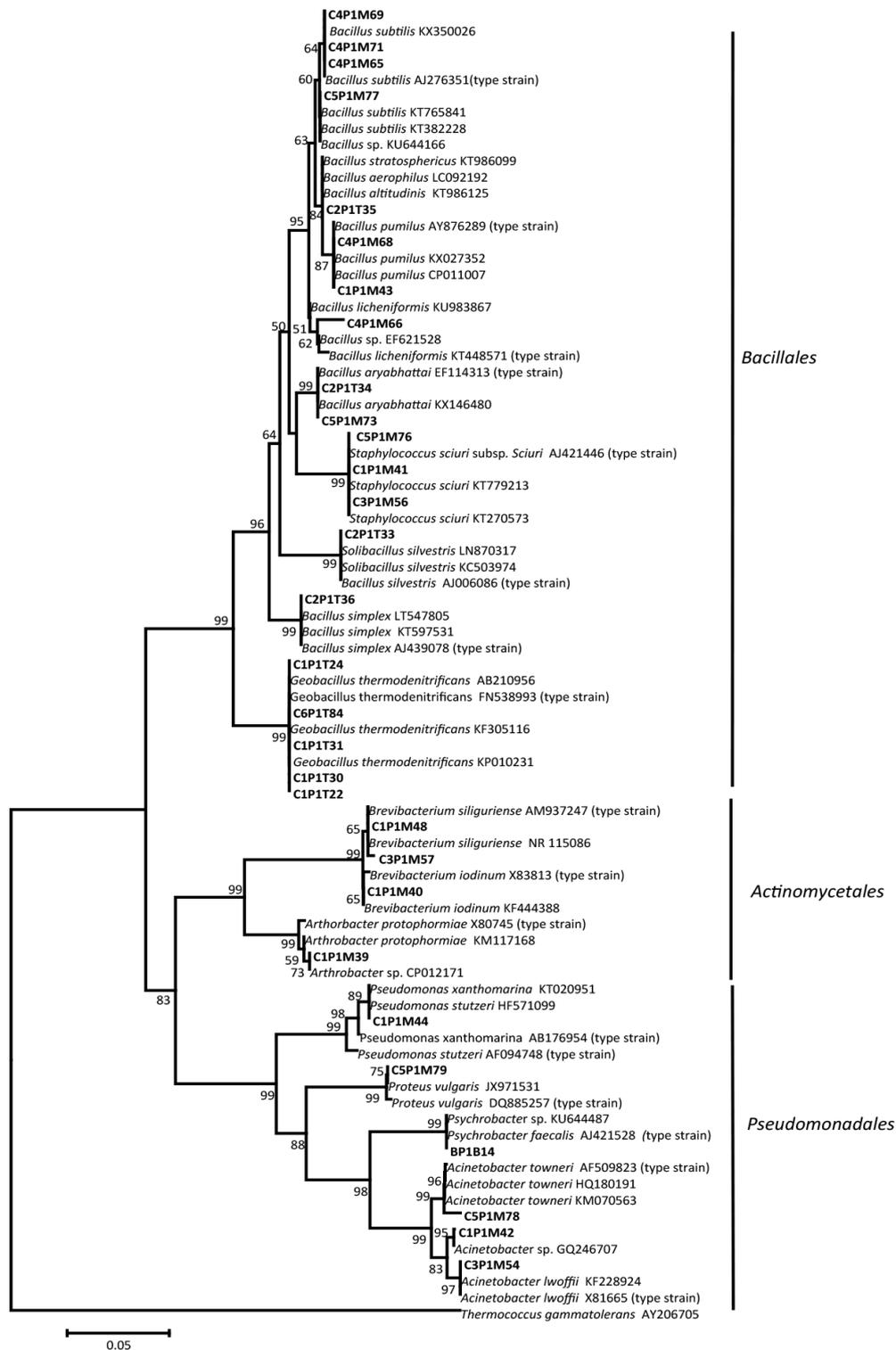


Figura 4.5. Árbol filogenético de las bacterias aisladas e identificadas mediante secuenciación del gen ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-joining. Los números de acceso corresponden a las secuencias homólogas obtenidas en el NCBI. La barra indica un 5% de divergencia. Los valores obtenidos por debajo de 50% no se muestran en el árbol.

En el estructurante vegetal sólo se identificó *Psychrobacter* sp. Los microorganismos aislados durante el compostaje coinciden con microorganismos característicos de este tipo de procesos, en los que las temperaturas alcanzadas (77 °C a los 12 días) pueden promover la supervivencia de la microbiota termófila, termotolerante y formadora de endosporas como *Bacillus* (López-González *et al.*, 2014). En estudios llevados a cabo por He y colaboradores (2013) y Karadag y colaboradores (2013), *Bacillus* fue el género predominante en etapas tempranas de compostaje, destacando además, la capacidad de las células vegetativas de degradar una gran diversidad de sustratos orgánicos.

De forma similar *Geobacillus*, otro género del orden *Bacillales*, también se caracteriza por crecer a temperaturas comprendidas entre 45 °C y 70 °C (Nazina *et al.*, 2001). Por otro lado, otros géneros, como *Pseudomonas* o *Acinetobacter* se han aislado en distintos procesos de compostaje. Algunas de estas cepas se consideran patógenos oportunistas, al igual que *Proteus* sp., y su presencia durante el compostaje puede estar asociada a la disminución de la temperatura, a la recolonización de coliformes fecales y a la realización de los volteos de la pila (Bhatia *et al.*, 2013; Hassen *et al.*, 2001).

4.1.7 Actividad enzimática durante el proceso de compostaje

Con el fin de analizar la relación entre las comunidades microbianas y la conversión de materia orgánica, se realizó un estudio de los cambios en las actividades enzimáticas a lo largo del proceso de compostaje (Fig. 4.6).

La actividad deshidrogenasa (Fig. 4.6a) alcanzó un máximo a los 5 días (170.87 μg de trifenilformazán $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$) y transcurridos 40 días la actividad descendió hasta el final del proceso. Esta tendencia coincide con los resultados obtenidos por Castaldi y colaboradores (2008), que encontraron una evolución similar de la actividad deshidrogenasa con valores mayores al comienzo del proceso y una disminución durante la fase de compostaje. La actividad deshidrogenasa ha sido propuesta como parámetro indicador del progreso de la actividad microbiana y por lo tanto, como un método útil para monitorizar el proceso de compostaje (Tejada *et al.*, 2006; Tiquia 2005). Está involucrada en numerosas reacciones metabólicas degradación de la

materia orgánica y liberación de energía a partir de la oxidación de la misma. En el compostaje estudiado, la mayor actividad deshidrogenasa coincidió con la mayor relación C/N (15.3), así como con la temperatura máxima alcanzada (70-75 °C).

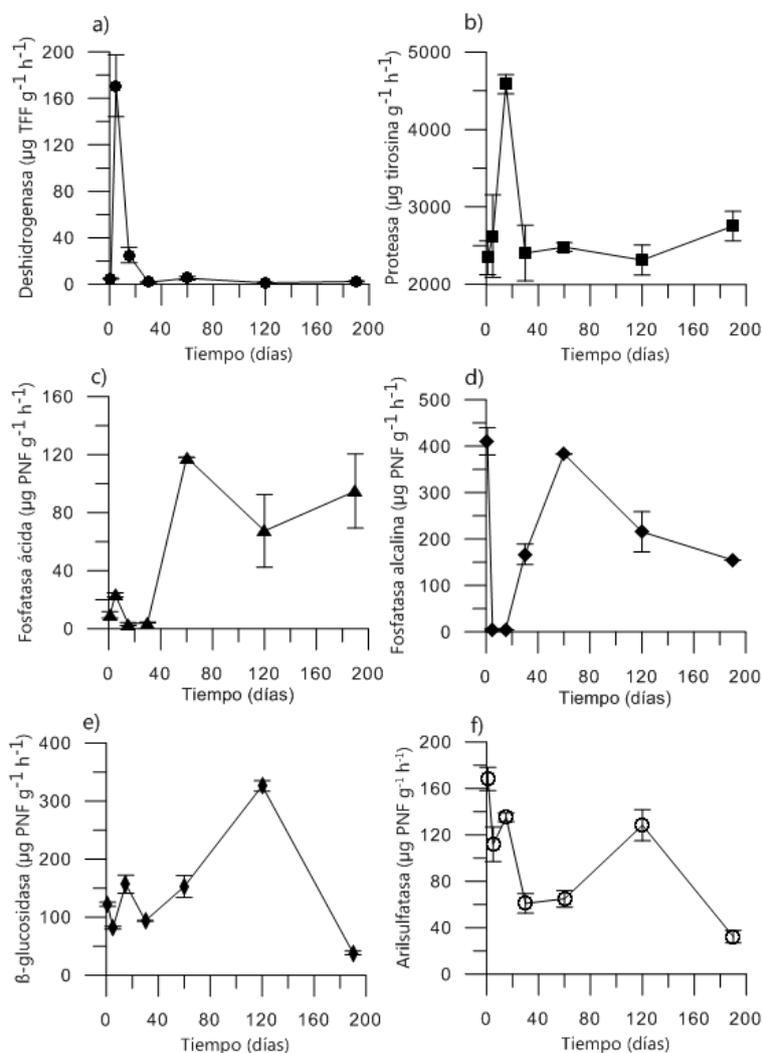


Figura 4.6. Evolución de las actividades enzimáticas de la Pila I. Deshidrogenasa a); proteasa b); fosfatasa ácida c); fosfatasa alcalina d); β-glucosidasa e) y arilsulfatasa f). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

La actividad proteasa (Fig. 4.6b) se intensificó en los primeros días de compostaje, alcanzando un valor máximo a los 15 días, (~4500 µg de tirosina g⁻¹ h⁻¹). Sin embargo, en la fase sin cubierta, la actividad proteasa disminuyó y mantuvo valores similares a lo largo de la etapa de maduración. Esta tendencia también ha sido descrita por Goyal y colaboradores (2005), que detectaron una mayor actividad proteasa coincidiendo con el mayor número de microorganismos. Los sustratos hidrolizables por proteasas son

proporcionados por el agente estructurante debido a su origen vegetal pero también por el lodo, ya que puede contener hasta un 20% de proteínas, constituyendo así una fuente idónea de N para los microorganismos (Díaz-Burgos *et al.*, 1993). El mantenimiento de la actividad proteasa hasta 60 días podría explicarse por una liberación gradual de compuestos hidrolizables a partir del material de partida.

La fosfatasa ácida (Fig. 4.6c) mostró un ligero incremento en los primeros 5 días pero, al final de la fase de compostaje bajo la cubierta, aumentó la actividad hasta alcanzar los valores más altos a los 60 días ($118 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). En la fase de maduración, disminuyó manteniéndose hasta el final del proceso.

La fosfatasa alcalina (Fig. 4.6d) mostró una tendencia similar a la de la fosfatasa ácida, registrando los valores más altos en los primeros días del compostaje ($410 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Esta actividad decayó a los valores más bajos durante el proceso bajo cubierta y a continuación se incrementó hasta un segundo máximo a los 60 días, cuando se retiró la cubierta, disminuyendo gradualmente hasta el final del proceso. Un comportamiento similar se ha visto en el estudio de Ros y colaboradores (2006). La alta actividad detectada en el primer día coincide con el elevado número de bacterias y hongos mesófilos (10^9 y 10^8 UFC g^{-1} , respectivamente). La fosfatasa alcalina puede considerarse un indicador preciso de la actividad microbiana en el compost, ya que es producida exclusivamente por microorganismos. En la etapa de maduración, cuando se retiró la cubierta, aumentaron tanto las fosfatasas ácidas como las alcalinas, siendo ésta la etapa en la que la pila se transportó al aire libre y se enfrió en condiciones ambientales. De esta manera, la materia orgánica y los nutrientes restantes podrían favorecer la producción de fosfatasa y la posterior estabilización de la materia orgánica (Criquet *et al.*, 2007).

Durante la fase de compostaje, la actividad β -glucosidasa (Fig. 4.6e) presentó valores oscilatorios bajo cubierta, con un incremento en la fase de maduración, alcanzando los valores máximos a los 120 días ($380.5 \mu\text{g } p\text{-nitrofenol}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y decayendo al final del proceso, tendencia similar que ha sido descrita por Castaldi y colaboradores (2008). La β -glucosidasa se considera un indicador de hidrólisis de materia orgánica, ya

que participa en la hidrólisis de los enlaces β 1-4 de la cadena β -glucósido de los carbohidratos y provoca una liberación de energía para la actividad microbiana. En este estudio, el lodo proporcionaría una gran cantidad de materia orgánica fácilmente oxidable y el agente estructurante materia orgánica lentamente hidrolizable, lo que explicaría la tendencia de los valores de actividad encontrados inicialmente (Tejada *et al.*, 2006).

La actividad arilsulfatasa está implicada en el ciclo del azufre, por lo que está relacionada con la formación de sustancias húmicas. En este estudio, se observó un descenso durante el compostaje bajo cubierta y un aumento al inicio de la etapa de compostaje, como se muestra en la figura 4.6f.

En resumen, la tendencia de la proteasa y deshidrogenasa mostró ser similar y se estabilizó a partir de los 15 días. En el caso de la fosfatasa ácida y alcalina, los valores más altos se alcanzaron a 0 y 60 días, respectivamente. La β -glucosidasa alcanzó el máximo a los 120 días y la arilsulfatasa los valores más altos se alcanzaron al inicio del proceso y a los 120 días.

4.1.8 Estudio de la diversidad microbiana durante el proceso de compostaje mediante técnicas de secuenciación masiva

• Análisis de los parámetros e índices descriptivos de la diversidad de la comunidad bacteriana

Los índices de α -diversidad se calcularon para proporcionar información ecológica y relativa al número de OTUs en las diferentes etapas del compostaje y se muestran en la tabla 4.6.

En todas las muestras, excepto en el día 120, el valor del índice de cobertura de Good fue $>98\%$, lo que indica que la profundidad de secuenciación fue apropiada para describir la diversidad. El valor más alto del número de OTUs se encontró en la muestra del lodo (619). El índice de Chao 1, relacionado con la riqueza, indicó que los materiales de partida tuvieron los valores más altos de riqueza (264 y 233 en el estructurante vegetal y en lodos, respectivamente). El índice de Chao 1 fue menor en los días 5 y 120.

Sin embargo, en los días intermedios, los valores subieron por encima de 100 y se hicieron más altos al final del proceso.

Los valores del índice de Simpson se situaron entre 0.62 y 0.91 al día 1 y 190, respectivamente, mostrando que a los 15 días y final del proceso había más diversidad que en tiempos iniciales. Los valores del índice de Shannon-Wiener (H') fueron más cercanos a 5 (valor considerado alto para éste índice) en los días 15 (3.392) y 190 (3.155), siendo la mayor diversidad registrada durante todo el proceso. El Índice de equitatividad dio el valor más alto (0.7072) el día 15.

Tabla 4.6. Estimación de la α -diversidad de los datos obtenidos por la secuenciación masiva con Illumina MiSeq en la Pila I.

Muestra	Nº de secuencias	Nº OTUs	Índice de Good	Nº especies	Índice de Chao 1	Índice de Simpson (1-D)	Índice de Shannon (H)	Equitatividad (J)
Lodo	35912	619	0.98	232	233.60	0.90	3.23	0.59
Estructurante	30735	581	0.98	263	264.70	0.90	3.45	0.62
1 día	40085	241	0.99	98	108.00	0.62	1.67	0.36
5 días	12403	125	0.98	59	70.00	0.78	1.92	0.47
15 días	37102	340	0.99	121	129.70	0.94	3.39	0.70
30 días	38239	285	0.99	128	134.90	0.81	2.72	0.56
60 días	22294	271	0.98	108	121.00	0.89	2.82	0.60
120 días	2370	59	0.97	34	36.50	0.83	2.15	0.61
190 días	27675	335	0.98	147	147.90	0.91	3.15	0.63

- *Dinámica y estructura de la comunidad bacteriana mediante Illumina MiSeq*

La figura 4.7 muestra la diversidad y sucesión de las comunidades microbianas identificadas usando técnicas de secuenciación masiva con Illumina MiSeq.

El agente estructurante se caracterizó por la presencia de dos órdenes principales, *Pseudomonadales* (42%) y *Actinomycetales* (23%). El agente estructurante procede de restos de poda vegetal, lo que podría explicar la presencia de ambas comunidades, como consecuencia de la mezcla con material de suelos (Lloret *et al.*, 2016). El perfil obtenido del lodo fue bastante diverso, siendo el orden predominante *Clostridiales*, con un porcentaje próximo al 30% en abundancia relativa. Los porcentajes de abundancia relativa entre el 1 y el 8% correspondieron a la clase *Actinobacteria* (orden desconocido), y a los órdenes *Rhizobiales* y *Burkhoderiales*, entre otros.

Al inicio del proceso de compostaje (tiempo 1 día) hubo un predominio del orden *Actinomycetales* con un 83% de abundancia, probablemente procedente del estructurante vegetal. Después de 5 días, el orden dominante fue el orden *Bacillales*, hecho que, al igual que se observa en los microorganismos cultivables, puede estar relacionado con la temperatura alcanzada a este tiempo (>70 °C).

A partir de los 15 días, la estructura de la comunidad bacteriana cambió notablemente. La abundancia de *Bacillales* a este tiempo fue el menor valor alcanzado durante el compostaje (2%), siendo su abundancia mayor del 15% en el resto de muestras. Hubo un aumento en la abundancia de los órdenes *Actinomycetales* (37%), *Sphingobacteriales* (27%) y *Pseudomonadales* (10%). Esta tendencia coincide con los datos publicados por Xiao y colaboradores (2011), quienes sugirieron que un pico de temperaturas superiores a 50 °C podría ser beneficioso para el crecimiento de *Actinomycetales*. A los 30 días, el perfil de diversidad fue similar al observado a los 15 días, con un aumento en el orden *Pseudomonadales* de hasta el 41% en abundancia relativa.

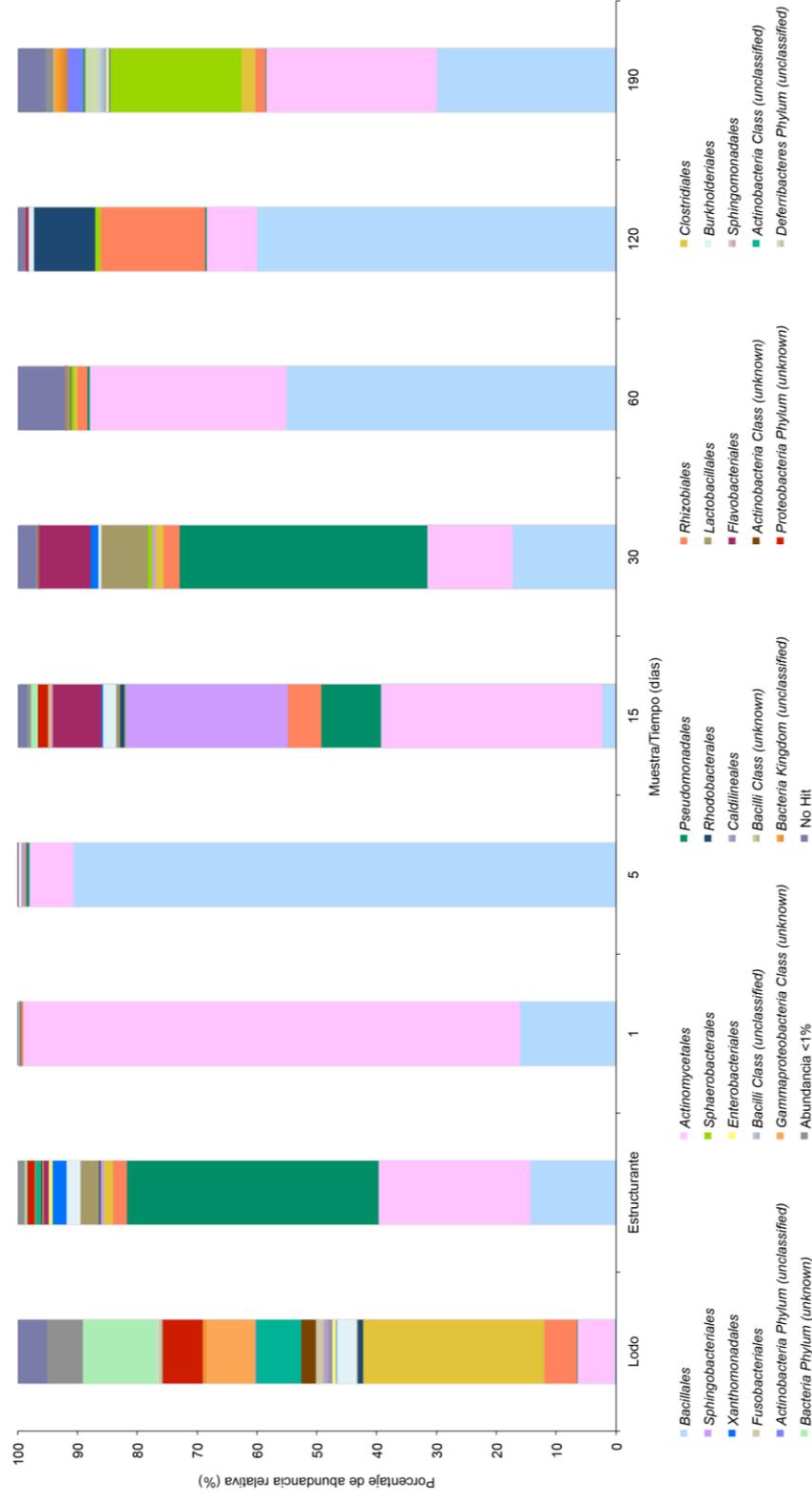


Figura 4.7. Porcentajes de abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de orden determinado mediante Illumina MiSeq de la Pila I. La categoría *unknown* se asignó cuando el algoritmo utilizado en la asignación taxonómica (USEARCH) no permitió establecer un nivel taxonómico con un nivel de confianza fiable a partir de 6 coincidencias. La categoría *unclassified* se asignó en los casos en los que la base de datos no contenía información suficiente para llegar a ese nivel taxonómico. La categoría *No Hit* significa que no hubo coincidencia con la base de datos utilizada en la asignación taxonómica. En la categoría Abundancia < 1% se incluyeron todos los órdenes con porcentajes inferiores al 1% en todas las muestras.

A los 60 días, se retiró la cubierta semipermeable y la temperatura descendió a 25 °C. Sin embargo, *Bacillales* y *Actinomycetales* proliferaron siendo los microorganismos predominantes en este momento, llegando al 55 y 32%, respectivamente. *Bacillales* mantuvo altos porcentajes al día 120 (59%). Los órdenes *Rhizobiales*, *Rhodobacterales* y *Actinomycetales* representaron el 17, 10 y 8% de abundancia relativa, respectivamente. Al final del proceso, *Bacillales*, *Actinomycetales* y *Sphaerobacterales* fueron los órdenes más destacables. Estos resultados demostraron que *Bacillales* y *Actinomycetales* podrían considerarse como la microbiota dominante durante todo el tiempo del compostaje, incluyendo la fase termófila y mesófila.

Según Agnolucci y colaboradores (2013), el compostaje se caracteriza por una alta diversidad y cambios graduales en las comunidades bacterianas y, según el perfil de diversidad obtenidos en este estudio, hay dos cambios importantes. En primer lugar, entre 15 y 30 días, se alcanzó la mayor diversidad (*Sphingobacterales* y *Flavobacteriales*, *Pseudomonadales* o *Rhizobiales*). Otro cambio importante ocurrió entre los días 120 y 190, donde 4 órdenes minoritarios aumentaron su abundancia relativa, como *Rhizobiales* y *Rhodobacterales*, así como *Sphaerobacterales* y *Clostridiales* a los 190 días. El aumento de temperatura en esta fase pudo deberse a la actividad microbiana, atribuida a las comunidades encargadas de la degradación de compuestos recalcitrantes característicos de esta fase. A su vez, estos microorganismos pueden producir metabolitos aprovechables por otras bacterias que contribuirían también a este incremento de la temperatura (Franke-Whittle *et al.*, 2014). Estos resultados podrían estar relacionados con la estabilización del compost al final de la etapa de maduración.

La figura 4.8 muestra los diferentes cambios de la estructura en la comunidad microbiana a nivel de familia, representados mediante un mapa de calor. Se detectaron un total de 95 familias. Las familias más representativas pertenecientes al orden *Actinomycetales* fueron *Brevibacteraceae* y *Dermabacteraceae* en el día 1 y *Nocardiospsaceae*, durante el estadio no cubierto. Para el orden *Bacillales*, las familias principales fueron *Bacillaceae* durante todo el proceso y *Planococcaceae*, *Staphylococcaceae* y *Thermoactinoycetaceae*, con altos valores de abundancia entre los días 30 y 60.

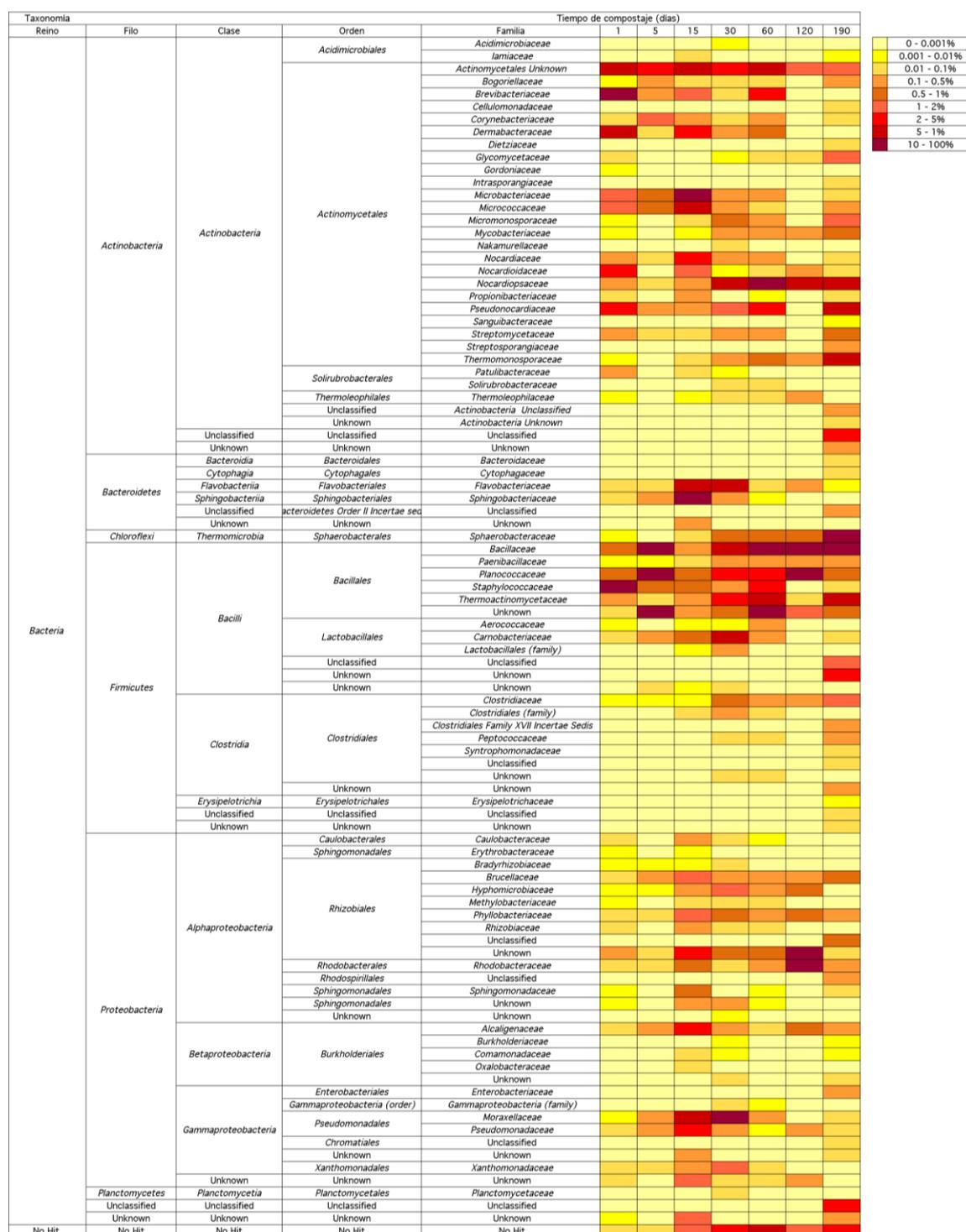


Figura 4.8. Análisis de la composición de la comunidad bacteriana del proceso de compostaje bajo cubierta semipermeable a nivel de familia. La categoría *unknown* se asignó cuando el algoritmo utilizado en la asignación taxonómica (USEARCH) no permitió establecer ese nivel taxonómico con un nivel de confianza fiable (a partir de 6 coincidencias). La categoría *unclassified* se asignó en los casos en los que la base de datos no contenía información suficiente para llegar a ese nivel taxonómico. La categoría *No Hit* significa que no hubo coincidencia con la base de

datos utilizada en la asignación taxonómica. En la categoría Abundancia < 1% se incluyeron todos los órdenes con porcentajes inferiores al 1% en todas las muestras.

Al final del proceso, día 190, el perfil mostró una gran diversidad a nivel taxonómico. Este aumento de la diversidad puede deberse al hecho de que el compost es estable en este momento y su perfil es similar al del estructurante vegetal.

4.1.9 Análisis estadístico del efecto de las variables físico-químicas y biológicas en proceso de compostaje

Para analizar las relaciones entre las variables estudiadas en la pila, se llevó a cabo un análisis estadístico.

En la figura 4.9 se muestra la distribución de las muestras mediante escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), de acuerdo con la abundancia relativa en el nivel de orden. Los vectores representan la correlación de rangos de Spearman de los factores físico-químicos representativos: porcentaje de fósforo total (% P₂O₅), humedad (%M), materia orgánica (%OM), carbono orgánico total (%COT), carbono inorgánico (%CI); relación carbono-nitrógeno (C/N); Nitrógeno total (NTK); temperatura (T), y las actividades enzimáticas. Las burbujas muestran la abundancia relativa de los órdenes predominantes en el proceso (con más del 50% de abundancia en una o más muestras). Los tamaños de las burbujas son proporcionales a la abundancia relativa de los órdenes predominantes.

Las actividades deshidrogenasa y β-glucosidasa mostraron una fuerte correlación positiva con el porcentaje de materia orgánica. El producto final principal de la actividad β-glucosidasa es la glucosa y la deshidrogenasa está implicada en la oxidación o reducción de sustratos por sustracción o adición de dos átomos de H. Por lo tanto, ambas actividades deben estar relacionadas con la presencia de sustratos fácilmente metabolizables y con la mayor actividad microbiana, como consecuencia de la relación entre la materia orgánica y estas dos actividades enzimáticas (Castaldi *et al.*, 2008; Vargas-García *et al.*, 2010). Se apreció una correlación negativa entre las deshidrogenasa

y β -glucosidasa y el porcentaje de carbono inorgánico (%CI) lo que indica que, al ser un proceso heterotrófico, el carbono requerido es predominantemente orgánico.

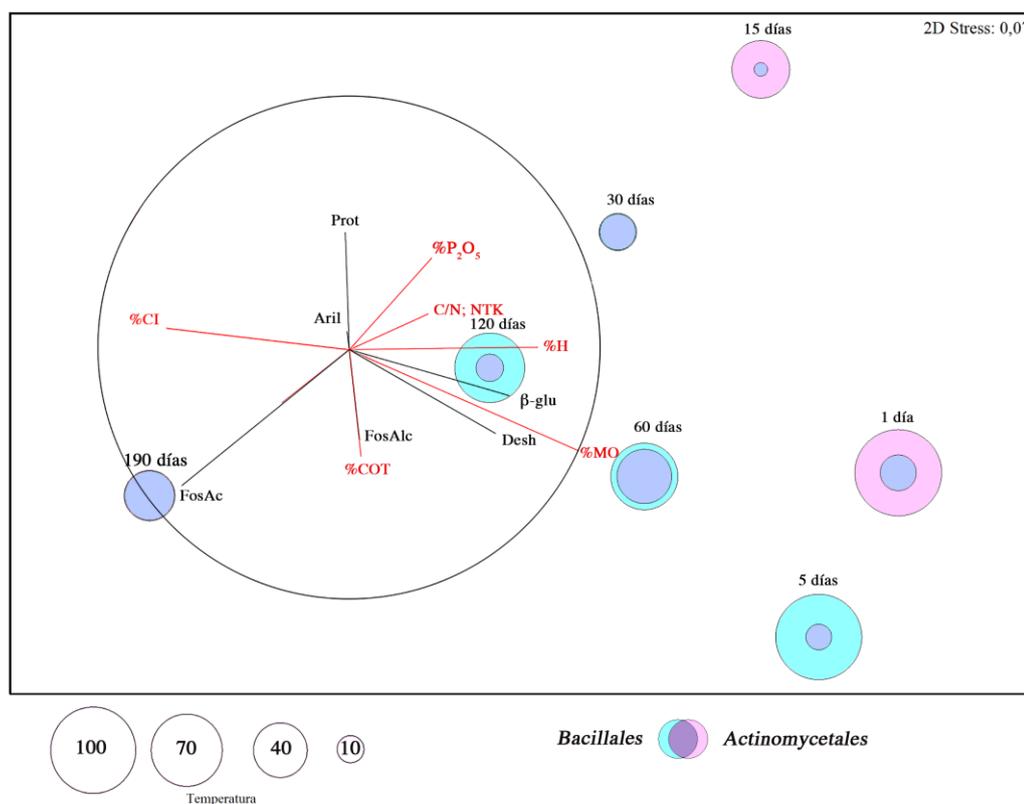


Figura 4.9. Escalamiento multidimensional (NMDS) de la distribución de las muestras de compostaje en función de las abundancias relativas a nivel de orden de las comunidades bacterianas. Las burbujas representan la abundancia relativa de los órdenes predominantes (*Bacillales* y *Actinomycetales*). Los vectores representan el rango de correlación de Spearman de los factores ambientales y de las actividades enzimáticas con el MDS. Los vectores rojos representan los factores ambientales: porcentaje de fósforo (%P₂O₅); relación carbono-nitrógeno (C/N); porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total (%NTK); porcentaje de humedad (%H); porcentaje de material orgánica (%MO); porcentaje de carbono orgánico total (%COT); temperatura (T); porcentaje de carbono inorgánico (%CI). Los vectores negros representan las actividades enzimáticas determinadas: arilsulfatasa (Aril; β -glucosidasa (β -glu); deshidrogenasa (Desh); fosfatasa alcalina (FosAlc) y fosfatasa ácida (FosAc).

La aireación no afectó a la temperatura, que fue generalmente termófila durante todo el proceso permitiendo la higienización del proceso tal y como se muestra en la tabla 4.3 en la concentración de coliformes. Según Chen y colaboradores (2014), la

descomposición es más rápida a altas temperaturas, por lo que el mantenimiento de temperaturas termófilas podría haber beneficiado la estabilización de los parámetros relacionados con la estabilización de la materia orgánica.

La relación C/N no mostró una correlación claramente positiva con ninguna actividad enzimática de acuerdo con la distribución relativa de la muestra de abundancia. Sin embargo, el vector de relación C/N fue correlacionado con el NTK, probablemente porque el alto contenido de NTK en el lodo de aguas residuales aumentó la relación C/N en la mezcla inicial.

Por otro lado, la tendencia de la fosfatasa ácida fue la opuesta a la del fósforo total. Usualmente, se detectan compuestos de fósforo en el compostaje de lodos (García *et al.*, 1993). Otros autores han observado un resultado similar con un incremento en el contenido de P inorgánico a menor actividad fosfatasa, debido a la inhibición de la fosfatasa por el fósforo inorgánico en el sistema del suelo. Además, se obtuvo una correlación negativa entre las actividades fosfatasas ácidas y alcalinas y el contenido de fósforo como ocurre en este estudio. Los microorganismos metabolizan fácilmente los compuestos de C y N proporcionados por el lodo y el estructurante vegetal, estimulando la actividad microbiana. La actividad microbiana se ve limitada por el P disponible, lo que restringe el crecimiento microbiano de algunos microorganismos. En consecuencia, la demanda de fósforo aumenta y el P es suministrado por microorganismos que movilizan P inorgánico a P asimilable (Albrecht *et al.*, 2010; Criquet *et al.*, 2007). Ambas fosfatasas mostraron una correlación positiva con el COT, que fue más pronunciada para la fosfatasa alcalina y la cual está asociada sólo a microorganismos (Raut *et al.*, 2008).

La actividad proteasa se ha considerado un indicador de la descomposición de la materia orgánica y depende del sustrato disponible (Lazcano *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011). Dicha actividad muestra una fuerte correlación negativa con el COT y también con las otras actividades enzimáticas, excepto con la actividad arilsulfatasa. Gómez-Silván y colaboradores (2013) obtuvieron resultados similares en un biorreactor de un sistema de tratamiento de aguas residuales, debido a una alternancia de hidrolasas dominantes, degradando sustratos de carbono como respuesta a los cambios en la temperatura y la

disponibilidad de nutrientes. Estos factores podrían explicar la misma correlación negativa entre la proteasa y las otras actividades enzimáticas.

Las distintas comunidades predominantes (*Bacillales* y *Actinomycetales*) se alternaron durante el proceso de compostaje. Ambas comunidades mostraron una correlación con la fosfatasa alcalina, deshidrogenasa y β -glucosidasa, que están influenciadas por la materia orgánica, lo que demuestra el importante papel de estos dos órdenes en el compostaje con cubierta semipermeable, pudiendo interpretar la evolución de estas actividades enzimáticas como un indicador del grado de estabilidad de la materia orgánica en el proceso de compostaje de lodos de aguas residuales.

En el proceso de compostaje los cambios importantes se observaron durante los primeros 30 días, cuando la pila de compost se encontraba bajo cubierta semipermeable y los análisis de diversidad microbiana evidenciaron un notable cambio a lo largo del proceso. Las actividades enzimáticas se estabilizaron en la etapa de maduración, indicando el final del proceso. Estos resultados, junto con el resto de parámetros físico-químicos, sugieren la posibilidad de reducir el tiempo bajo cubierta debido a la recolonización que hay entre los 15 y 30 días a pesar de mantenerse temperaturas altas.

4.2 Efecto de la cubierta semipermeable sobre las propiedades fisicoquímicas y biológicas durante el proceso de compostaje de la Pila II

Durante el proceso de compostaje de la Pila I, los parámetros requeridos por la legislación cumplieron con los valores establecidos. Este hecho, junto con los análisis microbiológicos, en lo que los mayores cambios se produjeron al inicio del proceso, sugirieron la posibilidad de acortar la fase bajo cubierta de 60 a 30 días y con el objetivo de abaratar el coste del proceso. Con estas características se construyó la Pila II, cuyos resultados se describen a continuación.

4.2.1 Monitorización de la temperatura

Los datos de la monitorización de la temperatura durante el proceso de compostaje de la Pila II se recogen en la figura 4.10. En los primeros 11 días, la temperatura aumentó hasta los 79 °C en el interior de la pila. Ésta se mantuvo en un rango termófilo, manteniéndose a 60 °C hasta los 25 días.

Transcurridos los 30 días de la fase de compostaje bajo la cubierta, se registraron valores por debajo de 50 °C en algunas partes de la pila. A partir de este momento, se inició la fase de maduración. Para ello, se retiró la cubierta, se regó y volteó y se mantuvo sobre los canales de aireación desconectados, a diferencia de la Pila I, que fue transportada a otra zona. De esta forma se pudo seguir el registro en continuo de la temperatura.

Entre los 30 y 40 días hubo un descenso notable de la temperatura hasta los 10 °C en la parte más superficial de la pila (0 cm), probablemente debido a las condiciones climatológicas, coincidiendo esta época de muestreo con el mes de diciembre. A partir de los 70 días y hasta el final del proceso, se alcanzaron valores máximos de 70 °C. Las causas del aumento de temperaturas en la fase de maduración suelen estar asociadas a la formación de chimeneas debido al calor liberado por la actividad microbiana.

Por otro lado, esta pila sólo fue volteada una vez durante la fase de maduración, a los 111 días del proceso, por lo que este hecho podría justificar las altas temperaturas durante dicha fase.

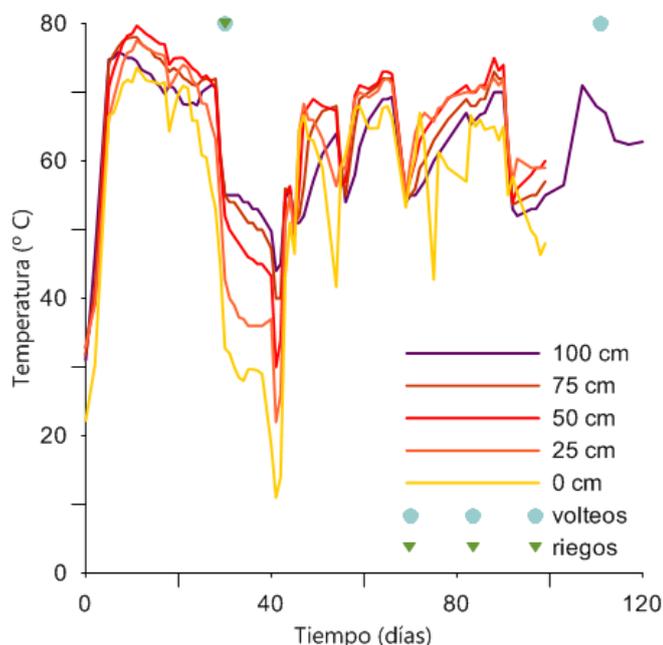


Figura 4.10. Evolución de la temperatura a lo largo del proceso de compostaje medido con una sonda a 0 cm, 25 cm, 75 cm y 100 cm de profundidad en la Pila II.

4.2.2 Evolución de los parámetros físico-químicos

Los resultados obtenidos en la primera pila permitieron determinar importantes cambios en la temperatura durante los primeros días. Por tanto, en la Pila II, se incluyeron más muestreos en los primeros días con respecto a la Pila I.

Se realizó igualmente la caracterización físico-química de los materiales a compostar, tanto del lodo como del estructurante vegetal; y se monitorizó su evolución durante el proceso de compostaje, realizando muestreos a los tiempos 0, 1, 5, 8, 14, 30, 40, 70 y 120 días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.7.

El lodo presentó una conductividad eléctrica (CE) elevada ($1446 \pm 35 \mu\text{S cm}^{-1}$) con una humedad cercana al 60% y un pH neutro (7.5 ± 0.1). La relación C/N del lodo fue de 6.55 y se determinó un alto contenido en fósforo. Además, mostró un 1.39% de carbono total

(%CT) casi en su totalidad orgánico (1.15%) y su porcentaje de sólidos volátiles (SV) fue de 66%.

El estructurante vegetal tuvo una CE baja en relación al lodo ($992 \pm 75 \mu\text{S cm}^{-1}$). Sus valores de pH y carbono orgánico oxidable (COx) fueron ligeramente superiores a los del lodo. La relación C/N fue superior a 30 debido principalmente a su contenido en N, casi 5 veces menor que en el lodo. El estructurante vegetal presentó un contenido en fósforo y humedad bajo, 0.02% y 11%, respectivamente. Con respecto al contenido de carbono tuvo un 0.85% de CT, mayoritariamente orgánico.

Durante el proceso de compostaje, la CE fue mayor que en los materiales de partida, alcanzando el valor máximo a los 30 días y decreciendo hasta un valor final de $1952 \pm 59 \mu\text{S cm}^{-1}$. Estos resultados tuvieron un rango similar a los resultados obtenidos por Yang y colaboradores (2016) en un proceso de co-compostaje, donde también se observó un aumento de la CE durante la fase de compostaje, probablemente debido a la liberación de sales minerales e iones amonio de la descomposición de la materia orgánica. De este modo, la volatilización del amonio así como la precipitación de dichas sales podrían explicar la disminución de la CE en la fase de maduración (Gao *et al.*, 2010).

Tabla 4.7. Parámetros físico-químicos determinados en el material de partida (lodo y estructurante vegetal) y en los muestreos del proceso de compostaje de la Pila II. CE: conductividad eléctrica; %H: porcentaje de humedad; %COx: porcentaje de carbono orgánico oxidable; %MO: porcentaje de materia orgánica; %SV: porcentaje de sólidos volátiles; %NTK: porcentaje de nitrógeno Kjeldahl total; C/N: relación carbono-nitrógeno; %P₂O₅: porcentaje de fósforo; %CT: porcentaje de carbono total; %CI: porcentaje de carbono inorgánico. Los valores representan el promedio de 3 réplicas ± el error absoluto.

Muestra/ Parámetro	Lodo	Estructurante	0 días	1 día	5 días	8 días	14 días	30 días	40 días	70 días	120 días
CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1446±35	992±75	1776±84	2160±105	2030±77	2090±86	2640±92	3180±140	1593±35	2780±94	1952±59
pH	7.49±0.12	7.76±0.13	7.1±0.1	7.33±0.13	7.32±0.12	7.00±0.12	6.85±0.12	6.86±0.12	7.71±0.13	7.84±0.13	7.19±0.13
%H	59.5±2	11±1	44±2	46.3±1	42.0±2	40.0±2	39.0±2	43.0±2	39.0±2	41.0±2	33.4±2
%COx	33±2	38±1	26±1	27±1	28±1	28±1	27±1	25±1	26±1	24±1	20±1
%MO	58±2	64±3	45±2	43±2	48±1	49±2	46±2	28±1	36±1	40±3	34±1
%SV	66±4	80±2	47±3	50±1	50±4	46±1	46±1	46±1	46±5	41±1	36±1
%NTK	5.10±0.50	1.20±0.05	2.2±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	0.88±0.01	0.69±0.05	0.71±0.01	0.89±0.01	0.82±0.1	1.53±0.01
C/N	6.55	30.42	11.95	24	28	32	39	35	29	29	13
%P ₂ O ₅	5.83±0.09	0.02±0.01	1.40±0.07	1.66±0.02	1.08±0.04	1.26±0.03	0.96±0.07	1.21±0.04	1.29±0.04	2.08±0.04	1.12±0.02
%CT	1.39,104±0.1	0.85 ± 0.10	0.7±0.1	0.87±0.10	1.03±0.10	0.78±0.10	1.42±0.10	0.17±0.10	0.44±0.10	0.55±0.10	0.28±0.10
%CI	0.24±0.01	0.12	0.12±0.01	0.14	0.17±0.10	0.12±0.10	0.17±0.10	0.02±0.10	0.02±0.10	0.04±0.10	0.20±0.10
%COT	1.1±0.1	0.73	0.6±0.1	0.73±0.10	0.86±0.10	0.66±0.10	1.25±0.10	0.15±0.10	0.42±0.10	0.51±0.10	0.08±0.10

Respecto a la humedad, se detectaron unos valores en torno al 40% durante todo el proceso, alcanzando el valor mínimo al final del compostaje con un 33.4%. Los SV se mantuvieron en torno al 45% durante los 30 primeros días y descendieron en la fase de maduración. El contenido de N de la mezcla inicial tuvo un valor medio entre los dos materiales de partida y disminuyó por debajo del 1% a partir de los 8 días, porcentaje que se mantuvo hasta el final del proceso, con un porcentaje final del 1.53%.

La relación C/N tuvo un valor alrededor de 30 durante gran parte del proceso, disminuyendo sólo al final de la fase de maduración. Respecto a los parámetros relacionados con el contenido en carbono, el %MO disminuyó notablemente durante la fase de compostaje hasta alcanzar el valor más bajo (28%) al final de la fase bajo cubierta. El %MO durante la fase de maduración estuvo entre el 34-40% hasta el final del proceso. La reducción del tiempo de proceso de compostaje con respecto a la Pila I de 190 a 120 días, mejoró el %MO alcanzando valores similares a los recomendados en el RD 506/2013. Por otro lado, los valores de humedad (%H) y la relación C/N fueron más altos que en la Pila I pero dentro de los límites establecidos por el Real Decreto.

4.2.3 Metales pesados

Las concentraciones de los metales pesados se recogen en la tabla 4.8. Los resultados mostraron un contenido elevado de Zn y Cu en el lodo de partida. El estructurante vegetal tuvo unas concentraciones dentro de los límites permitidos, compatibles con un compost de Clase A, exceptuando su contenido en Cd.

No se observó una reducción de ningún metal con respecto a la mezcla de partida durante todo el proceso, lo que limitó la clasificación del compost final a la Clase B, siendo el metal más limitante el Cd.

Aunque el compostaje aeróbico es considerado una estrategia efectiva para la eliminación de metales pesados (Yang *et al.*, 2016) en este caso no supuso una reducción de los mismos.

Tabla 4.8. Contenido en metales pesados en el material de partida y en las muestras durante el proceso de compostaje de la Pila II.

Concentración (ppm)	Cu	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
Lodo	119	2.0	14	28	80	511
Estructurante	38	1.5	6	15	10	169
0 día	78	1.5	42	32	41	408
1 día	76	2	33	31	50	503
5 días	83	2	40	39	49	363
8 días	93	2	45	44	50	442
15 días	85	2	48	38	40	416
30 días	105	3	73	50	51	488
40 días	93	2	41	38	37	447
70 días	120	1.5	41	51	46	425
120 días	92	2	45	41	46	437
Compost Clase A*	70	0.7	70	25	45	200
Compost Clase B*	300	2	250	90	150	500
Compost Clase C*	400	3	300	150	200	1000

*Clasificación del RD 506/2013

4.2.4 Determinación de microorganismos patógenos

La concentración de *E. coli* y *Salmonella* en la muestra del lodo estuvo por encima de los límites establecidos (Tabla 4.9), a diferencia del estructurante vegetal, donde los valores determinados se encontraban por debajo de los permitidos.

La mezcla inicial mostró resultados positivos para ambos microorganismos y esta tendencia se mantuvo hasta los 8 días, coincidiendo con la fase de mayor temperatura. Al inicio de la fase de maduración (30 días) y coincidente con la bajada de la temperatura, se detectaron valores por encima de los fijados por el RD 506/2013. Sin embargo, al final del proceso, los valores decrecieron cumpliendo así con la normativa.

Tabla 4.9. Determinación de los microorganismos patógenos en la Pila II.

Muestra/ Tiempo	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp</i>
Lodo	>1100	Presencia/25 g
Estructurante	7.4	Ausencia/25 g
0 días	>1100	Presencia/25 g
1 día	>1100	Presencia/25 g
5 días	>1100	Presencia/25 g
8 días	0	Ausencia/25 g
14 días	0	Ausencia/25 g
30 días	>1100	Presencia/25 g
40 días	>1100	Presencia/25 g
70 días	0	Ausencia/25 g
120 días	<3	Ausencia/25 g
Valores límite RD 506/2013	<1000 (NMP)	Ausencia/25 g

4.2.5 Enumeración de la microbiota cultivable

La enumeración de la microbiota cultivable en los materiales de partida mostró que el lodo tenía menor cantidad de microorganismos cultivables que el agente estructurante, ya que sólo se detectó la presencia de bacterias mesófilas, con un contenido de 7.2 ± 0.5 Log UFC g^{-1} , (Tabla 4.10).

Por el contrario, en el estructurante se detectaron bacterias mesófilas y termófilas a una concentración próxima a 7 Log UFC g^{-1} , al igual que la cantidad de hongos mesófilos y termófilos, aunque los hongos se encontraron con un orden de magnitud menor con respecto a las bacterias.

Tabla 4.10. Enumeración de la microbiota bacteriana y fúngica en el material a compostar de la Pila II (Log UFC g^{-1}). El error se estimó con la desviación típica de tres repeticiones.

Log UFC g^{-1}	Lodo	Agente estructurante
Bacterias mesófilas	7.2 ± 0.5	6.8 ± 0.2
Bacterias termófilas	ND	7.10 ± 0.01
Hongos mesófilos	ND	6.2 ± 0.2
Hongos termófilos	ND	5.3 ± 0.5

ND: no detectado

En la gráfica de la evolución de la microbiota bacteriana mesófila y termófila (Fig. 4.11) se observa un leve crecimiento en los primeros días seguido de un notable

descenso a los 5 días para bacterias mesófilas y a los 8 en bacterias termófilas, hecho que coincide con el incremento de temperaturas hasta los 79 °C, que podría inhibir el crecimiento microbiano. Hasta los 15 días hubo un descenso de ambas poblaciones que comenzaron a recuperarse en los últimos días de la fase bajo cubierta. Las bacterias mesófilas presentaron una recuperación más pronunciada entre los 15 y 40 días, coincidiendo con un rango de temperatura más favorable, por debajo de 50 °C. Por el contrario, la recuperación de las bacterias termófilas fue más lento y prosiguió hasta los 70 días, tiempo a partir del cual ambas poblaciones se estabilizaron hasta el final del proceso.

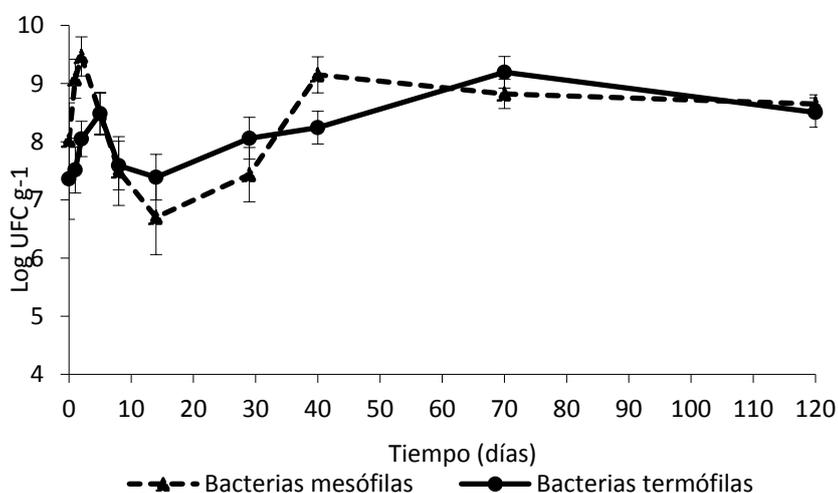


Figura 4.11. Evolución de la microbiota bacteriana durante el proceso de compostaje de las Pila II expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

En la figura 4.12 se muestra la evolución de la población fúngica. En términos generales, se detectaron concentraciones menores en comparación con las poblaciones bacterianas, del orden de 2 unidades logarítmicas. En los dos primeros días del proceso hubo una estimulación de ambas poblaciones: mesófilas y termófilas, mientras que a partir del día 5, al inicio de la fase termófila, se detectó un descenso acusado de la comunidad mesófila. La población bacteriana termófila se mantuvo prácticamente estable entre los 5 y 8 días. Hacia el final de la fase de compostaje bajo cubierta semipermeable, ambas poblaciones aumentaron, aunque las temperaturas decrecieron

favoreciendo las condiciones mesófilas. La población mesófila aumentó coincidiendo con el rango de temperaturas mesófilas.

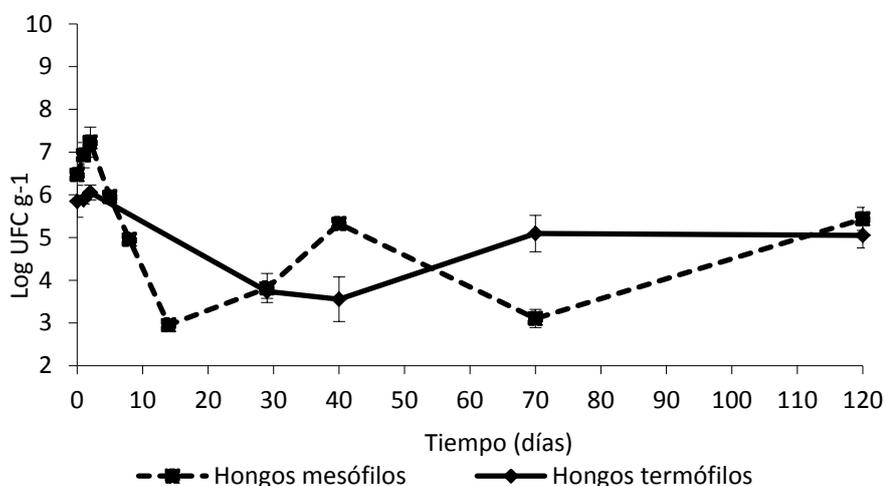


Figura 4.12. Evolución de la microbiota fúngica durante el proceso de compostaje de la Pila II expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

En la fase de maduración, el aumento en la temperatura se vio reflejado en una tendencia de crecimiento para la población termófila y en una disminución de la población mesófila hasta los 70 días. Al final del proceso, ambas poblaciones se estabilizaron hasta alcanzar concentraciones similares.

La evolución de la microbiota presentó la concentración más alta al inicio del proceso y la población fúngica decreció drásticamente a temperaturas superiores de 50 °C y no se recuperó hasta el final del proceso. Esta tendencia coincide con otros estudios de pilas con aireación forzada en los que la mayor concentración de heterótrofos aeróbicos se determinó al inicio del proceso (Tiquia *et al.*, 2005).

4.2.6 Actividades enzimáticas durante el proceso de compostaje

La evolución de las actividades enzimáticas determinadas en estos ensayos se recoge en la figura 4.13.

La actividad deshidrogenasa (Fig. 4.13a) mostró dos picos de actividad muy altos: al inicio y a los 30 días. Los valores altos de actividad deshidrogenasa en las fases

iniciales del proceso están asociados a la oxidación de los compuestos orgánicos lábiles que son catalizados por esta enzima (Vargas-García *et al.*, 2010). En este estudio los valores más altos de actividad deshidrogenasa se alcanzaron durante la fase bajo cubierta, al inicio y a los 30 días (final del periodo bajo cubierta). Una tendencia similar ha sido demostrada en pilas de compostaje a escala real mezclados con desechos vegetales (Nikaeen *et al.*, 2015). Al igual que en la Pila I, la mayor actividad deshidrogenasa coincidió con el valor más alto de la relación C/N y con temperaturas superiores a los 60 °C. A partir de los 40 días, hubo una bajada de actividad y después se mantuvo estable hasta el final del proceso. La actividad deshidrogenasa ha sido considerada usualmente como un indicador de estabilización de la materia orgánica por su implicación en la cadena respiratoria, como se ha mencionado con anterioridad (Barrena *et al.*, 2008; Castaldi *et al.*, 2008; Vargas-García *et al.*, 2010).

La actividad proteasa (Fig. 4.13b) mostró los valores más altos durante la fase bajo cubierta, con dos picos notables a los 5 y 8 días (por encima de los 12000 μg de tirosina $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$). A partir de este tiempo, la actividad decreció hasta llegar a un mínimo a los 40 días, coincidiendo con la fase de maduración. Estos valores que se mantuvieron estables hasta el final de proceso. Las proteasas están especialmente activas al inicio del compostaje. Como consecuencia de la hidrólisis, se producen aminoácidos y ácidos orgánicos que podrían explicar el descenso de pH detectado en la fase bajo cubierta, como se muestran en los datos de la tabla 4.7. Los valores obtenidos en esta actividad fueron similares a los valores más altos alcanzados en otros procesos de compostaje de residuos sólidos municipales llevados a cabo por Awasthi y colaboradores (2015) y Raut y colaboradores (2008) en el compostaje de lodos.

Los valores iniciales de la fosfatasa ácida (Fig. 4.13c) alcanzaron los 700 μg PNF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$, descendieron a partir del primer día del proceso hasta alcanzar un mínimo a los 8 días (200 μg PNF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$). A continuación, los valores se incrementaron hasta el final de la etapa bajo cubierta (30 días). Durante la fase de maduración se observó un descenso hasta los 70 días y una estabilización en valores próximos a 200 μg PNF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

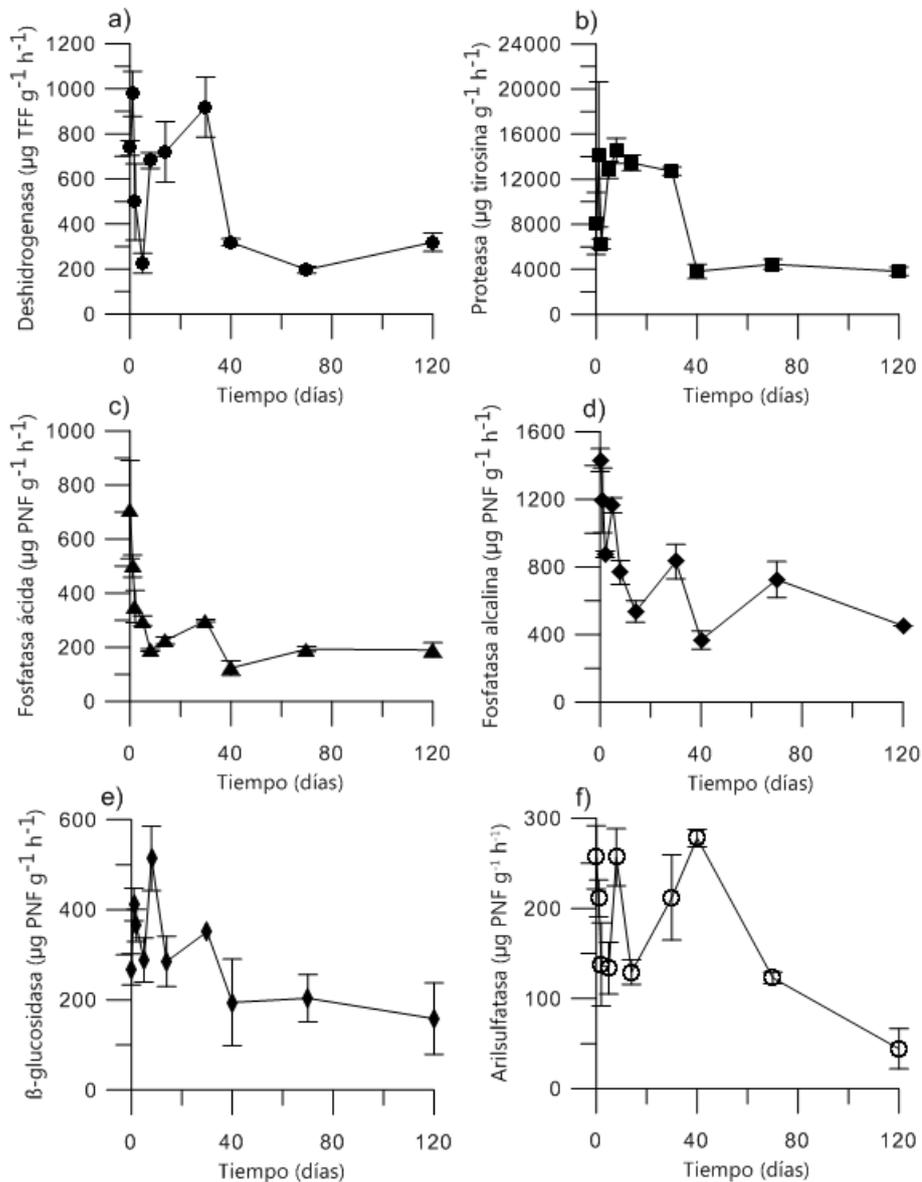


Figura 4.13. Evolución de la actividad enzimática durante el proceso de compostaje de la Pila II: Deshidrogenasa a); proteasa b); fosfatasa ácida c); fosfatasa alcalina d); β -glucosidasa e) y arilsulfatasa f). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

La actividad fosfatasa alcalina (Fig. 4.13d) mostró una tendencia marcada por varios picos en la fase bajo cubierta semipermeable, a 0, 8 y 30 días, con unos valores del orden de 800–1400 $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Los valores altos para la actividad fosfatasa en la fase inicial podrían estar asociados a la carga de fosfatos del material de partida.

La actividad β -glucosidasa (Fig. 4.13e) mostró tres máximos significativos al inicio del proceso (por encima de los 400 $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) en el día 1 y 8. Durante la fase de

maduración, se mostraron valores constantes en torno a los 200 $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ hasta el final del compostaje. Al igual que ocurría en la Pila I, los altos valores de β -glucosidasa al inicio pueden deberse a la degradación inicial de los sustratos fácilmente metabolizables, como se han descrito en procesos similares de compostaje (Echeverría *et al.*, 2012). El incremento de esta actividad cercano a los 30 días podría estar asociado a la recuperación de la población de hongos mesófilos, considerados una pieza clave en la degradación de sustancias poliméricas como la celulosa, hemicelulosa o lignina y cuya correlación con esta actividad ha sido descrita con anterioridad (Tiquia *et al.*, 2002).

La actividad arilsulfatasa (Fig. 4.13f) tuvo una tendencia similar a la actividad β -glucosidasa durante la etapa de compostaje bajo cubierta, destacando los picos alcanzados en el tiempo 0 y 8, (por encima de los 256 $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Durante la fase de maduración se alcanzó el valor máximo de 277 $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ al inicio (40 días) y a partir de este tiempo, hubo una disminución drástica hasta el final del proceso. La actividad arilsulfatasa tiene un papel clave en la mineralización de compuestos orgánicos sulfurados. La tendencia de valores más altos de esta actividad al inicio del proceso podrían indicar una alta disponibilidad de este sustrato proporcionado por el lodo (Kızılkaya y Bayraklı, 2005). Los valores obtenidos para esta actividad coinciden con los valores reportados por Mondini y colaboradores (2004), con valores máximos en torno a los 300 $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$, sin embargo, con una tendencia diferente, probablemente debido al material de partida y los parámetros operacionales.

4.2.7 Estudio de la diversidad bacteriana durante el proceso de compostaje mediante técnicas de secuenciación masiva

• Análisis de los parámetros e índices descriptivos de la diversidad de la comunidad bacteriana

Con el objetivo de obtener información ecológica relativa a las comunidades bacterianas del proceso de compostaje se determinaron los índices de α -diversidad de las muestras analizadas (Tabla 4.11).

Tras el análisis bioinformático, se observó que en la mayoría de las muestras se alcanzaron valores por encima de las 10000 secuencias, incluso en la muestra de 8 días se obtuvieron casi 95000 secuencias. Tras la asignación de OTUs, se obtuvieron valores entre 2300-6500 OTUs en función de la muestra, siendo el tiempo 8 días el que mayor número de OTUs mostró.

En cuanto al índice de cobertura de Good, en algunas muestras se obtuvo un valor por debajo del 98%, indicativo de que podría haberse aumentado la diversidad con una mayor profundidad de secuenciación. Estas muestras correspondieron a los días 2, 5, 14, 30, 40 y 120 días. El índice de Chao 1, fue mayor en las muestras de los días 5 y 40 (por encima de 5000), mientras que en el resto de muestras estuvo entre los 2400-3200. Los valores del índice de Simpson se situaron entre 0.91 y 0.98, excepto en la muestra del estructurante vegetal, que tuvo un valor del 0.88. En el caso del índice de Shannon se obtuvieron valores por encima de 5 en todas las muestras, considerando por tanto, que existe una distribución de la abundancia equitativa.

Tabla 4.11. Estimación de la α -diversidad de los datos obtenidos mediante secuenciación masiva con Illumina MiSeq en la Pilla II.

Muestra	Nº de secuencias	Nº OTUs	Índice de Good	Nº especies	Índice de Chao 1	Índice de Simpson (1-D)	Índice de Shannon (H)	Equitatividad (J)
Lodo	44065	2374	0.99	2374	2416.66	0.98	8.09	0.72
Estructurante	50422	3465	0.98	3465	3686.49	0.96	7.93	0.67
1 día	61007	3009	0.98	3009	3643.69	0.88	6.68	0.52
2 días	29811	2295	0.96	2295	2996.47	0.91	6.01	0.59
5 días	44271	5159	0.96	5159	5870.61	0.98	9.14	0.74
8 días	94466	6560	0.98	6560	7406.57	0.96	8.16	0.64
14 días	38100	3531	0.96	3531	4387.66	0.98	8.45	0.71
30 días	44182	3408	0.97	3408	4129.01	0.98	8.34	0.71
40 días	46830	4642	0.97	4642	5168.53	0.95	8.43	0.69
70 días	57876	3307	0.97	3307	3987.57	0.91	6.91	0.59
120 días	27575	2341	0.98	2341	3169.18	0.98	8.08	0.72

En la figura 4.14 se muestra el análisis de coordenadas principales (PCoA) basada en el algoritmo UniFrac, con el fin de conocer si los linajes filogenéticos entre las muestras son significativamente diferentes. En el PCoA de la comunidad bacteriana, se observó un gradiente temporal en función de las muestras, siendo la muestra de lodo la más alejada en la distribución espacial, indicando que la sucesión de las comunidades bacterianas se alejan de las comunidades propias del lodo.

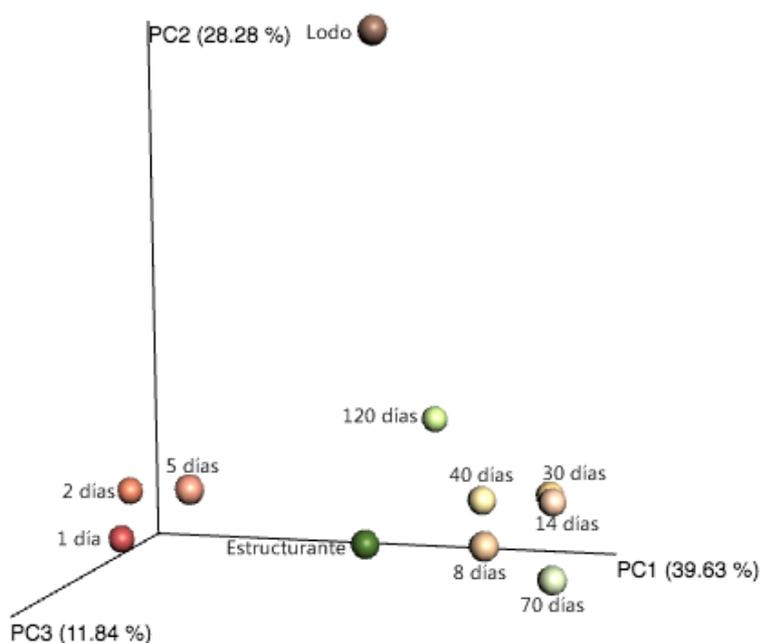


Figura 4.14. Análisis de los componentes principales (PCoA) basado en el algoritmo UniFrac de la comunidad bacteriana de las distintas muestras del proceso de compostaje de la Pila II.

- *Dinámica y estructura de la comunidad bacteriana mediante Illumina MiSeq*

Los resultados obtenidos en la secuenciación con Illumina MiSeq en este experimento se muestran en la figura 4.14.

Como se puede observar, el perfil de la comunidad del lodo presentó mayor diversidad que el del estructurante, compuesto mayoritariamente por *Rizhobiales* (26%), que junto con *Clostridiales* (15%) *Actinomycetales* (21%) y *Burkholderiales* (9%), constituyeron más del 70% de la abundancia total. En los grupos minoritarios destacó la presencia de *Neisseriales* (3%) y *Rhodospirillales* (4%), entre otros. La mayoría de estos órdenes han

sido descritos previamente en lodos, excepto *Rhizobiales* (Zhang *et al.*, 2012). El perfil de la comunidad bacteriana del estructurante vegetal, estuvo compuesto en más de un 80% por los órdenes *Bacillales* y *Actinomycetales*. Otros órdenes presentes en el estructurante vegetal, con menor porcentaje de abundancia fueron *Rhizobiales* (4%) y *Burkholderiales* (2%), entre otros.

A pesar de que los perfiles de diversidad del lodo y del estructurante fueron diferentes, algunos órdenes como *Actinomycetales*, *Rhizobiales* y *Burkholderiales* estuvieron presentes en ambos materiales de partida, con porcentajes superiores al 2% (Fig. 4.15).

En general, se observó una evolución de los perfiles de diversidad a lo largo del proceso de compostaje. En las muestras del día 1, los órdenes mayoritarios fueron *Bacillales* (33%) y *Actinomycetales* (17%). También destacó la presencia del orden *Lactobacillales* (26%) y *Pseudomonadales* (17%), mostrando, por tanto, la influencia del estructurante vegetal. En menor porcentaje destacaron *Enterobacteriales* con una abundancia relativa del 4% (Fig. 4.15).

A los 2 días del inicio del proceso, el perfil de las comunidades bacterianas fue similar al del día inicial, con un ligero incremento en la abundancia relativa del orden *Pseudomonadales*.

A los 5 días, se observó una disminución de la comunidad de *Pseudomonadales* frente a un aumento del orden *Clostridiales*. Este orden, previamente descrito durante procesos de compostaje, se ha asociado a la degradación de compuestos celulósicos (Zhang *et al.*, 2014b).



Figura 4.15. Porcentajes de abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de orden determinado mediante Illumina MiSeq de la Pila II. Las categorías que no fueron clasificadas al nivel de orden con un nivel de confianza fiable se le asignaron su nivel taxonómico superior

A partir de los 8 días, coincidiendo con una subida de la temperatura de la pila por encima de los 70 °C (Fig. 4.10), se observaron cambios drásticos en el perfil de la comunidad bacteriana, favoreciéndose la presencia del orden *Bacillales*, con un porcentaje de abundancia relativa del 73% y una disminución en la población de *Actinomycetales* (11%). Las especies pertenecientes a *Enterobacteriales*, redujeron su población hasta porcentajes inferiores al 1% desde este día hasta el final del proceso. En este mismo sentido, cuando se alcanzaron las temperaturas más altas de la fase bajo cubierta (14 días), las poblaciones como *Bacillales* y *Actinomycetales* se mantuvieron. *Bacillales* tuvo una abundancia relativa del 45%, mientras que *Actinomycetales* disminuyó su abundancia relativa hasta un 5%. Otros órdenes como *Clostridiales* (8%), *Sphaerobacterales* (15%), *Rhizobiales* (3%), *Burkholderiales* (2%) y *Thermales* (9%) mostraron un aumento en su abundancia relativa.

A los 30 días, el perfil de diversidad fue muy similar al de los 14 días, con valores muy similares y un predominio del orden *Bacillales* (43%), aumentando progresivamente a los 40 días (51%) y hasta los 70 días (83%), como consecuencia de las altas temperaturas alcanzadas. Este hecho provocó el desplazamiento de *Actinomycetales*, *Pseudomonadales*, *Clostridiales*, *Rhizobiales* y *Burkholderiales*, que quedaron reducidas a porcentajes del 3% o inferiores, durante esta etapa del compostaje.

Al final del proceso (120 días), aumentó la diversidad bacteriana con abundancias relativas distribuidas de manera más homogénea entre los órdenes *Bacillales*, *Actinomycetales*, *Pseudomonadales*, *Sphaerobacterales*, *Burkholderiales* y *Rizhobiales* como los más representativos, con abundancias entre el 4 y 25%. El aumento de diversidad en la fase de maduración después de varias fases de cambios drásticos en las comunidades podría ser propuesto como indicativo de la estabilización de las poblaciones y del proceso.

• *Evolución de las comunidades bacterianas del material de partida en el compostaje*

En la figura 4.16 se muestra la evolución en las poblaciones bacterianas utilizando la herramienta Source Tracker. Como puede observarse, el porcentaje de señal está dividido entre las poblaciones procedentes del lodo, del agente estructurante y un porcentaje de señal de origen desconocido.

Al inicio del proceso, el porcentaje de señal procedente del estructurante tuvo unos valores en torno al 50% y en el lodo un 35%. Conforme avanzó el proceso, la señal de las poblaciones bacterianas procedentes del estructurante tendió a incrementarse hasta el final de proceso, alcanzando un 74% de señal hasta el día 30, indicando que el estructurante fue la principal fuente de microorganismos.

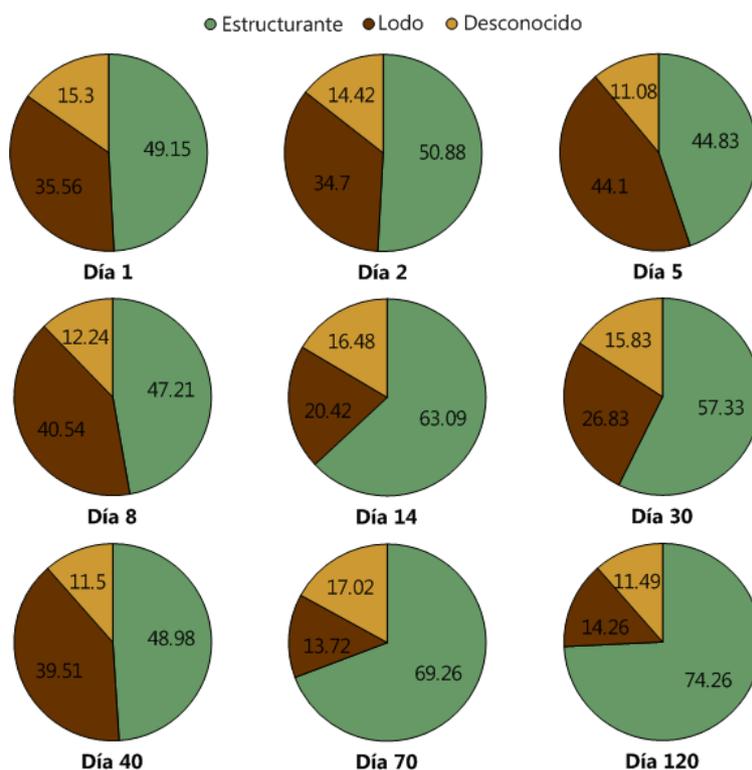


Figura 4.16. Evolución del porcentaje de señal de las comunidades bacterianas exclusivas del material de partida (lodo y estructurante vegetal) a lo largo del proceso de compostaje de la Pila II analizado mediante Source Tracker .

La señal procedente de las comunidades del lodo se mantuvo próxima al 50% durante los 5 primeros días. Sin embargo, el incremento de la temperatura permitió el aumento de la señal de las comunidades procedentes del estructurante vegetal en la fase bajo cubierta a partir de los 8 días. La eliminación de la cubierta, unida al descenso de las temperaturas, favoreció el porcentaje de señal procedente del lodo en el día 40. Sin embargo, durante la etapa de maduración, la señal de las comunidades procedentes del estructurante vegetal aumentó hasta valores próximos al 75% al final del proceso. Este resultado pone de manifiesto que el perfil de la comunidad bacteriana al final del proceso está constituido por una población procedente fundamentalmente del estructurante.

4.2.8 Estudio de la diversidad fúngica durante el proceso de compostaje mediante técnicas de secuenciación masiva

• Análisis de los parámetros e índices descriptivos de la diversidad de la comunidad fúngica

Los índices de α -diversidad para la comunidad fúngica en cada muestra se recogen en la tabla 4.12.

En todas las muestras se obtuvieron más de 20000 secuencias llegando a obtener más de 100000 secuencias en la muestra de 2 días. El número de OTUs determinado en las muestras se situó entre los 1606 (tiempo 2 días) y 148 (tiempo 40 días).

Según el índice de cobertura de Good, en todas las muestras el valor fue de 0.99, lo que indicaría que la profundidad de secuenciación fue la óptima para la secuenciación.

En cuanto al índice de Chao 1, fue mayor en las muestras correspondientes al lodo y al tiempo 2. En la PCoA, ambas muestras se encuentran muy cerca, indicado la similitud entre las dos, probablemente debido al número de secuencias y de OTUs determinados en ambas muestras. La muestra con el índice de Chao 1 más bajo fue la del tiempo 40, coincidiendo con la muestra de menor número de secuencias.

El índice de Simpson estuvo por encima de 0.94 en todas las muestras, excepto a los 8 y 14 días. El índice de Shannon estuvo por encima de 5 en todas las muestras excepto a los 14 días, 30, 40, 70 y 120 días. En cuanto a la equitatividad, esta se situó por encima de 0.53 en todas las muestras, excepto los 14 días, cuyo valor fue el más bajo con 0.42.

Tabla 4.1.2. Estimación de la α diversidad de los datos obtenidos mediante secuenciación masiva usando Illumina MiSeq para las comunidades fúngicas de la Pila II.

Muestra	Nº de secuencias	Nº OTUs	Índice de Good	Nº especies	Índice de Chao 1	Índice de Simpson (1-D)	Índice de Shannon (H)	Equitatividad (J)
Lodo	90249	990	0.99	990	1052.03	0.95	6.06	0.60
Estructurante	44885	684	0.99	684	707.42	0.94	5.50	0.58
1 día	40219	482	0.99	482	550.00	0.95	5.49	0.61
2 días	103981	1606	0.99	1606	1757.03	0.94	5.80	0.54
5 días	43281	527	0.99	527	587.17	0.95	5.54	0.61
8 días	21795	486	0.99	486	543.54	0.88	5.12	0.57
14 días	38144	388	0.99	388	475.31	0.76	3.69	0.42
30 días	61003	660	0.99	660	744.00	0.90	4.97	0.53
40 días	15750	148	0.99	148	170.00	0.90	4.34	0.60
70 días	55020	242	0.99	242	257.41	0.61	2.18	0.27
120 días	38477	320	0.99	320	340.76	0.89	4.24	0.50

En la figura 4.17 se muestra la PCoA para las comunidades fúngicas donde se observa la evolución temporal. Las muestras iniciales están más cercanas a la muestra procedente del estructurante vegetal, mientras que las muestras correspondientes a la fase de maduración están cercanas entre sí. Esta similitud de las muestras a 1, 5 y 8 días fueron más semejantes al estructurante vegetal coincidiendo con la señal de las poblaciones fúngica del estructurante en las muestra iniciales, excepto en el día 2. Sin embargo, las muestra del lodo y tiempo 2, se encontraron más cercanas, evidenciando una mayor similitud entre ellas.

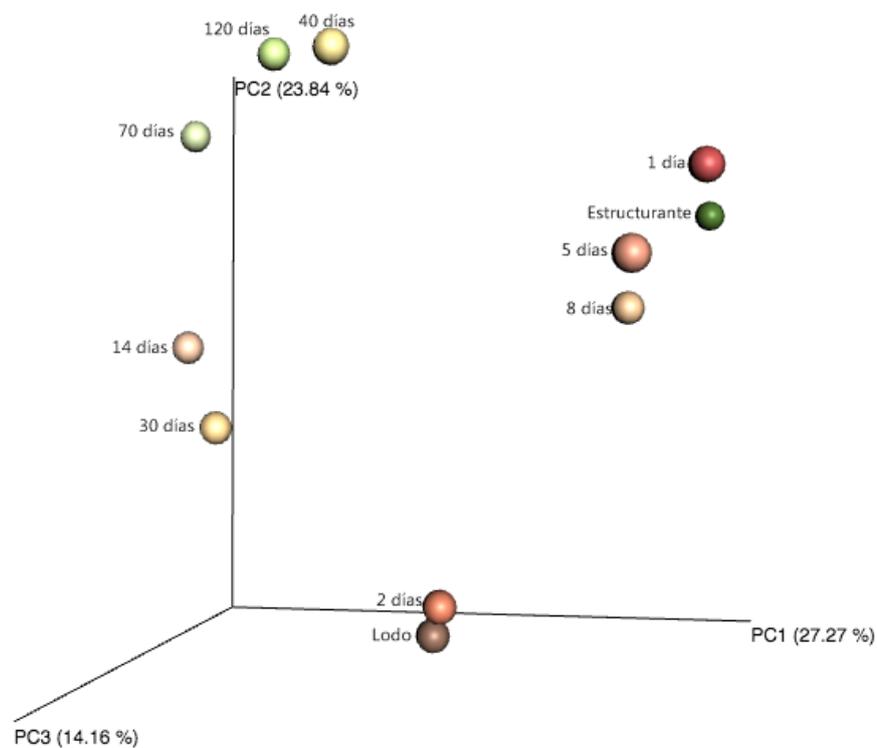


Figura 4.17. Análisis de los componentes principales (PCoA) mediante Bray-Curtis de las comunidades fúngicas de las distintas muestras del proceso de compostaje de la Pila II.

• *Dinámica y estructura de la comunidad fúngica mediante Illumina MiSeq*

Los resultados de los análisis de la población fúngica se muestran en la figura 4.18.

La población fúngica en el lodo se caracterizó por la presencia de un alto porcentaje en abundancia relativa del orden *Saccharomycetales* (41%) y *Agaricales*

(30%), pertenecientes a los filos *Ascomycota* y *Basidiomycota*, respectivamente. En el lodo también destacó un porcentaje considerable de hongos pertenecientes a la clase *Chytridiomycota*. El orden *Saccharomycetales* ha sido un orden previamente descrito en digestores de lodos anaerobios y se ha evidenciado su aumento a medida que se incrementa la temperatura (Sun *et al.*, 2015). Su presencia se mantuvo entre el 4-25% entre los 8 y los 30 días, cuando se alcanzaron las máximas temperaturas bajo la cubierta semipermeable. La clase *Chytridiomycota* también ha sido previamente descrita en sistemas de tratamiento de aguas, en biorreactores de membrana sumergida, aunque es característico en ecosistemas de agua dulce, por su rol en la degradación de compuestos como la celulosa o la hemicelulosa (Gleason *et al.*, 2008).

La población fúngica del estructurante vegetal estuvo principalmente dominada por la presencia del orden *Eurotiales*, con una abundancia relativa del 54%. También la clase *Ascomycota* (18%) y el orden *Sporidiobolales* (8%). La clase *Ascomycota* ha sido ampliamente descrita en procesos de compostaje de residuos agrícolas (Zhang *et al.*, 2016) por lo que explica su presencia en el estructurante vegetal.

Es destacable que en todas las muestras haya un porcentaje de abundancia relativa entre 6-32%, que no se han podido identificar más que a nivel de reino. Esto supone una pérdida de información considerable, pudiendo corresponderse con nuevas clases aún por determinar en hongos.

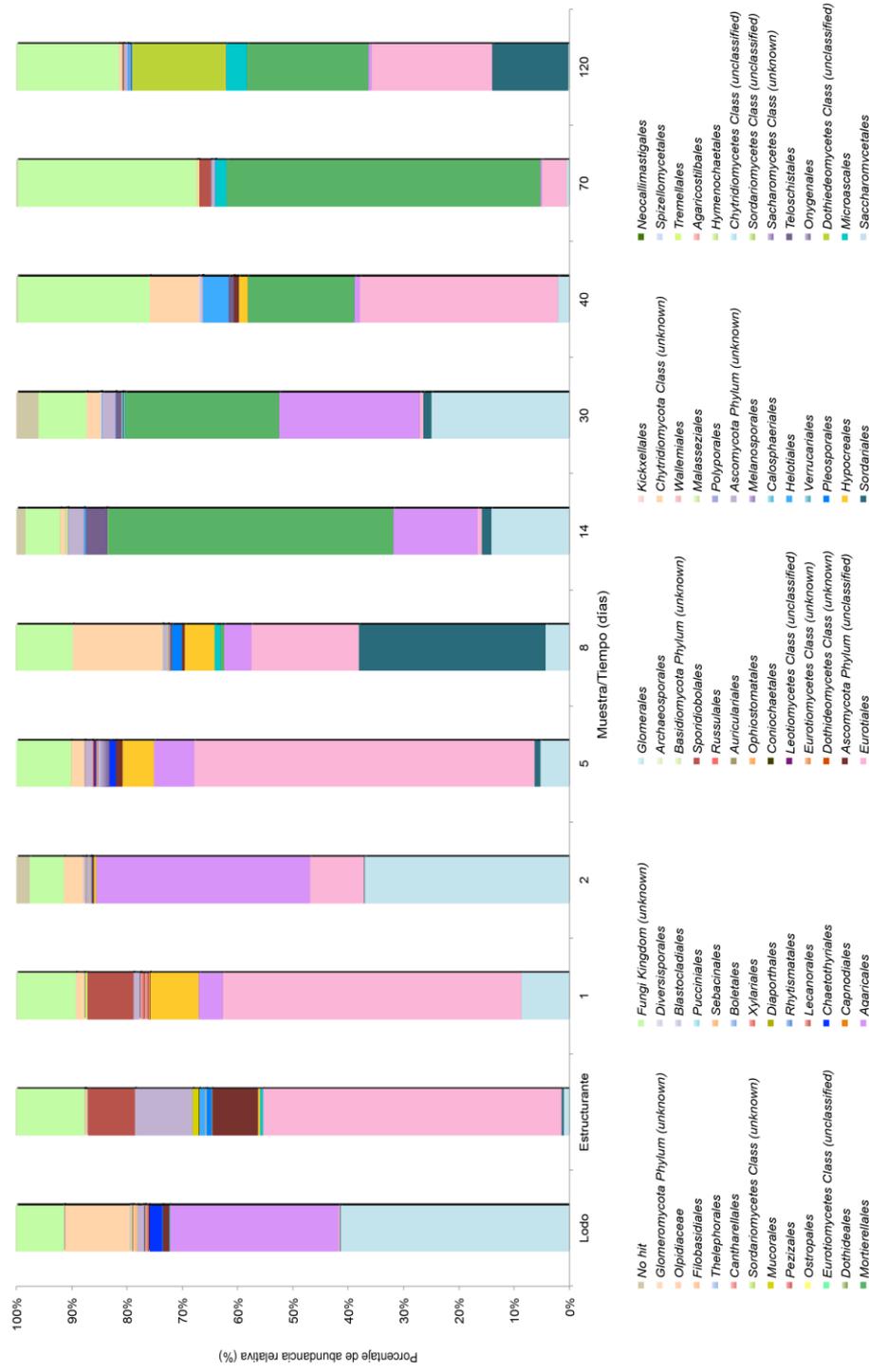


Figura 4.18. Porcentajes de abundancia relativa de la comunidad fúngica a nivel de orden determinado mediante Illumina MiSeq de la Pila II. Las categorías que no fueron clasificadas al nivel de orden con un nivel de confianza fiable se le asignaron su nivel taxonómico.

La población fúngica correspondiente al primer día tuvo un perfil idéntico al estructurante vegetal en relación al orden *Eurotiales* (54%) y *Sporidiobolales* (8%). En cambio la mezcla de materiales de partida pudo provocar una disminución en las poblaciones de *Saccharomycetales* (9%) y *Agaricales* (4%), previamente descritas en el lodo. Por otro lado, el orden *Hypocreales* (9%) también estuvo presente en la muestra del tiempo 1, pero no fue identificado en ninguno de los materiales de partida. Su presencia puede estar asociada al suelo dónde se construyó la pila, ya que son conocidos como hongos filamentosos saprótrofos y patógenos vegetales propios de suelos (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014a).

A los 2 días hubo un cambio notable en el perfil poblacional, con un perfil más parecido al lodo que al estructurante, probablemente porque las condiciones del proceso favorecieran la proliferación de comunidades como los *Saccharomycetales* y *Agaricales*, desplazando a los órdenes procedentes del estructurante como el orden *Eurotiales* (10%). Estudios previos han descrito órdenes como *Saccharomycetales* en las primeras fases del proceso, favorecidos por valores bajos de pH, ocasionados por la liberación de ácidos orgánicos procedentes de la degradación del material fácilmente metabolizable (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014b).

A partir del día 5 del proceso, coincidiendo con un aumento de la temperatura, la población dominante estuvo representada por el orden *Eurotiales*, alcanzando una abundancia relativa del 62%. En este orden se agrupan géneros muy resistentes a condiciones adversas y extremas como *Penicillium* o *Aspergillus* (Harms *et al.*, 2011). Las comunidades de *Saccharomycetales* disminuyeron hasta una abundancia relativa del 5%. El resto de órdenes representativos en este tiempo fue muy similar al tiempo inicial.

Transcurridos los 8 días hubo una sucesión en la población de hongos, predominando el orden *Sordariales* (34%) y el orden *Chytridiomycota*, pudiendo haberse visto favorecidas por el aumento de temperatura que alcanzó valores de 77 °C en el interior de la pila. El orden *Sordariales* ha sido considerado un orden característico

de procesos de compostaje con especies termófilas y termotolerantes (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014b).

A los 14 y 30 días, se observó una colonización de hongos incluidos en el orden *Mortierellales*, pertenecientes a la subdivisión *Mucoromycotina*, con distintos grados de abundancia. Especies como *Mortierella* se han asociado a procesos de compostaje, dada su ecofisiología saprótrofa, capaces de degradar hemicelulosa (Neher *et al.*, 2013). En esta etapa continuaron apareciendo órdenes como *Agaricales* (15%) y *Saccharomycetales* (14%).

A los 40 días, se apreció un cambio en la comunidad con un aumento de *Eurotiales* y un descenso en la abundancia relativa de *Mortierellales* (19%) y la clase *Chytridiomycota* (9%). La abundancia del orden *Helotiales* fue de un 5%, un orden que estuvo presente en fases previas, pero en porcentajes de abundancia muy bajos (<0.5%). Probablemente, este cambio del perfil de diversidad fuese el resultado de la disminución de la temperatura, unido a la disponibilidad de un sustrato más accesible, como consecuencia de la actividad bacteriana, la disminución del pH y de la presencia de compuestos recalcitrantes de difícil degradación. Especies como *Aspergillus* y *Penicillium* (orden *Eurotiales*) son capaces de degradar este tipo de compuestos, incluidos hidrocarburos alifáticos, clorofenoles, PAHs, pesticidas y colorantes. Esta tendencia ha sido descrita previamente por Neher y colaboradores (2013) que observaron un incremento de representantes del orden *Eurotiales* después de la fase termófila.

En la finalización del proceso (120 días), se observó una mayor diversidad con un predominancia de órdenes como *Mortierellales* (22%), *Sordariales* (14%), *Microascales* (4%), *Eurotiales* (22%) y de la clase *Dothideomycetes* (17%). Al igual que en el caso de las comunidades bacterianas, el perfil de diversidad en estas muestras fue más diverso, homogéneo y diferente a los perfiles de las muestras durante el compostaje.

• *Evolución de las comunidades fúngicas del material de partida en el compostaje*

En la figura 4.19 se muestra la evolución del porcentaje de señal de la población fúngica procedente de ambos materiales de partida a lo largo del proceso.

En este caso, la evolución de la señal fue más drástica con respecto a la comunidad bacteriana (Fig. 4.15). Al inicio del compostaje hubo una señal predominante de la comunidad fúngica procedente del estructurante, pero esta situación se invirtió el segundo día con el incremento de la señal procedente del lodo, la cual se intensifica progresivamente alcanzando más del 80% a los 30 días. En la fase de maduración, a los 40 días del inicio del proceso, la señal del estructurante se recuperó, pero no es hasta el final del mismo cuando su señal fue mayoritaria, indicando que, de forma general, el lodo fue la principal fuente de microorganismos durante todo el proceso, salvo en la fase inicial y final.

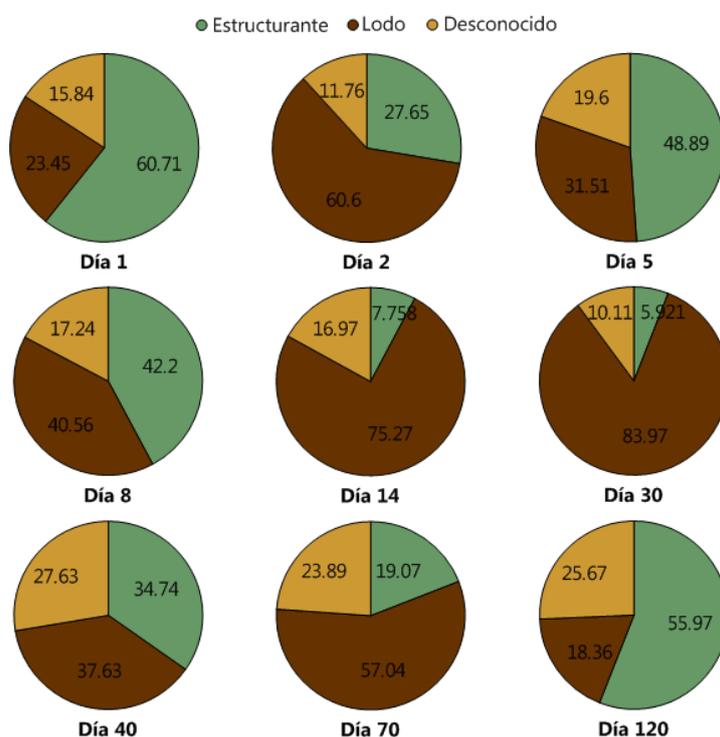


Figura 4.19. Evolución del porcentaje de señal de las comunidades fúngicas exclusivas del material de partida (lodo y estructurante vegetal) a lo largo del proceso de compostaje de la Pila II analizado mediante Source Tracker.

4.2.9 Estudio estadístico del efecto de las variables del proceso de compostaje de la Pila II

Con el objetivo de analizar la influencia de las variables fisicoquímicas en las comunidades microbianas se realizó un análisis multidimensional no-métrico (NMDS), de acuerdo con las abundancias relativas obtenidas de las secuenciación (Fig. 4.15 y 4.18).

La distancia entre las muestras refleja su similitud relativa. Los vectores representados reflejan dos grupos de variables: los parámetros físico-químicos y las actividades enzimáticas. El nivel de estrés estuvo por debajo de 0.1 en ambos NMDS (para bacterias y hongos) lo cual indica que esta es una representación apropiada para las muestras y permite una visualización más concisa de los cambios graduales en las muestras representadas. La longitud del vector representa la fuerza y el sentido de la correlación y las burbujas representan los valores de temperatura de cada muestra.

En la distribución de las comunidades bacterianas (Fig. 4.20), se observó una diferencia mayor entre la muestra correspondiente al día 1 y el resto de tiempos, las muestras del día 5 y 8 se situaron más cercanas y en el caso de los días 14 y 30, su distribución en el análisis NMDS es coincidente, debido a la similitud de los perfiles de diversidad de ambas y a la estabilidad de la temperatura durante este periodo. Las muestras del tiempo 40 y del 120 fueron más similares entre ellas que con respecto al día 70, independientemente de la temperatura.

Se realizó el análisis BEST, con el fin de determinar el subconjunto de variables abióticas que mejor coincide con las similitudes de los datos de abundancia relativa, utilizando el algoritmo BIO-ENV. Los factores ambientales que mejor explicaron esta distribución fueron la humedad, carbono, los sólidos volátiles y el nitrógeno (BEST: 0.373). Los parámetros físico-químicos relacionados con el contenido de C, mantuvieron una relación positiva, como es el caso del %SV, %C, %COT y %H. La relación C/N mostró una correlación negativa con el %NTK. La CE mostró una correlación negativa con el %SV, la actividad arilsulfatasa y la humedad.

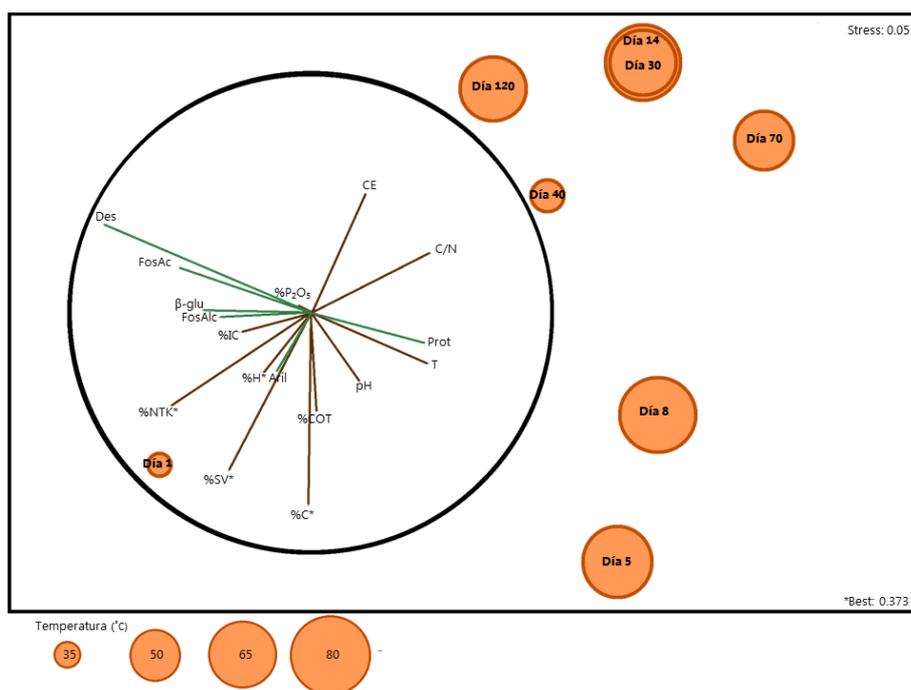


Figura 4.20. Escalado multidimensional no-métrico (NMDS) de la distribución de las muestras de compostaje, basado en las abundancias relativas a nivel de orden de las comunidades bacterianas (NMDS). Las burbujas representan la temperatura (°C) de los distintos tiempos del proceso. Los vectores representan la correlación de Spearman y la influencia direccional de los factores ambientales y de las actividades enzimáticas en la distribución de las muestras de abundancia relativa del proceso de compostaje. Los vectores verdes representan las actividades enzimáticas determinadas: deshidrogenasa (Des); proteasa (Prot); fosfatasa ácida (FosAc); fosfatasa alcalina (FosAlc); β -glucosidasa (β -glu) y arilsulfatasa (Ari). Los vectores azules representan los factores ambientales: porcentaje de fósforo ($\%P_2O_5$); relación carbono-nitrógeno (C/N); porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total (%NTK); porcentaje de humedad (%H); porcentaje de material orgánica (%MO); porcentaje de carbono orgánico total (%COT); temperatura (T); porcentaje de carbono inorgánico (%CI). Los parámetros resultantes del análisis BEST está marcado con un asterisco (*).

La actividad deshidrogenasa tuvo mayor correlación con la fosfatasa ácida y la actividad β -glu presentó correlación positiva con la fosfatasa alcalina. Estas 4 actividades mostraron una correlación negativa con la actividad proteasa y positiva con el carbono inorgánico. Ninguna de las actividades enzimática, excepto la arilsulfatasa, mostró una correlación con los parámetros físico-químicos relacionados con el carbono orgánico.

En la figura 4.21 se muestra el análisis NMDS de la distribución de las comunidades fúngicas. En este caso, las muestras correspondientes al día 1 y 5 fueron similares, mientras que la del día 8 se situó más alejada. Por otro lado, los muestreos posteriores correspondientes a los días 14, 30 y 40 fueron semejantes. Finalmente, las muestras del día 70 y 120, presentaron mayor nivel de semejanza demostrando así la evolución del perfil de diversidad en función del tiempo.

El análisis de BEST determinó que el carbono, los sólidos volátiles y el nitrógeno fueron los factores ambientales que mejor explicaron los cambios en la comunidad fúngica (BEST: 0.494). Este análisis coincide con el descrito anteriormente (Fig. 4.20) para las comunidades bacterianas, exceptuando la humedad, que sólo tuvo relación en el análisis de la comunidad bacteriana.

Según el análisis NMDS, la tendencia de algunos de los parámetros físico-químicos y de las actividades enzimáticas respecto a la diversidad de las comunidades fúngicas (Fig. 4.21) fue similar a la representada para la comunidad bacteriana (Fig. 4.20). Algunas de las tendencias generales se repitieron en ambas comunidades, como las correlaciones positivas entre los parámetros relacionados con el contenido de carbono orgánico (%C, %SV, %COT), la humedad y la actividad arilsulfatasa; la correlación negativa entre el %NTK y el C/N; la correlación negativa entre el C/N y el %NTK y la relación positiva entre las enzimas fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y β -glucosidasa y opuesta a la proteasa.

Considerando la distribución de los hongos, los parámetros físico-químicos relacionados con el contenido de carbono orgánico están correlacionados con la actividad arilsulfatasa, como en el caso de la comunidad bacteriana, pero en este caso también con la deshidrogenasa. La CE también tuvo una correlación negativa con el pH. El resto de parámetros mostró una correlación menor, como se puede observar en la longitud de los vectores, en el caso de la deshidrogenasa y el $\%P_2O_5$.

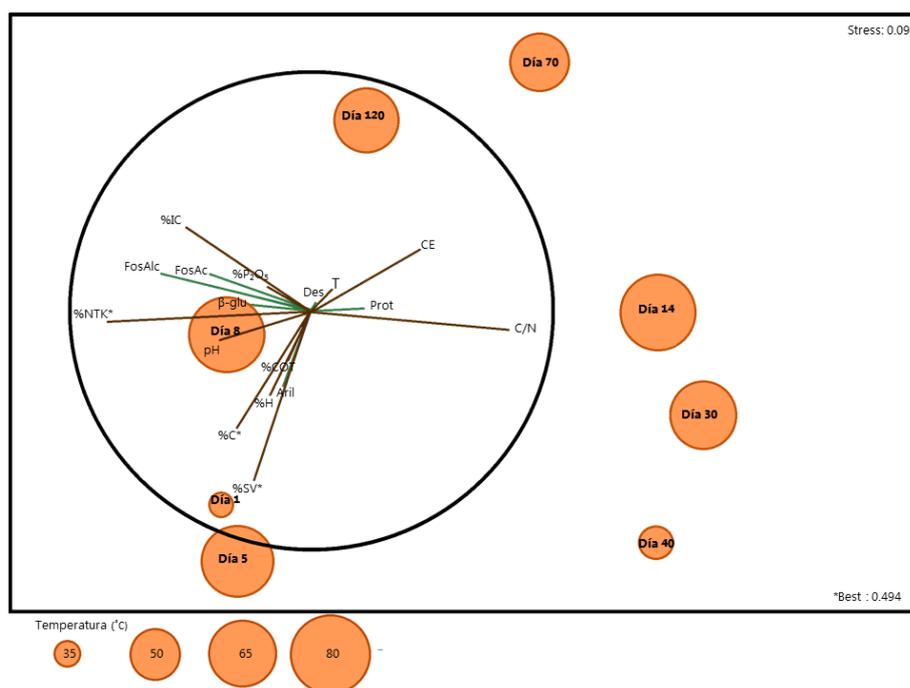


Figura 4.21. Escalado multidimensional no-métrico (NMDS) de la distribución de las muestras de compostaje, basado en las abundancias relativas a nivel de orden de las comunidades fúngicas. Las burbujas representan la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de los distintos tiempos del proceso. Los vectores representan la correlación de Spearman y la influencia direccional de los factores ambientales y de las actividades enzimáticas en la distribución de las muestras de abundancia relativa del proceso de compostaje. Los vectores verdes representan las actividades enzimáticas determinadas: deshidrogenasa (Des); proteasa (Prot); fosfatasa ácida (FosAc); fosfatasa alcalina (FosAlc); β -glucosidasa (β -glu) y arilsulfatasa (Ari). Los vectores azules representan los factores ambientales: porcentaje de fósforo ($\%P_2O_5$); relación carbono-nitrógeno (C/N); porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total ($\%NTK^*$); porcentaje de humedad ($\%H$); porcentaje de material orgánica ($\%MO$); porcentaje de carbono orgánico total ($\%COT$); temperatura (T); porcentaje de carbono inorgánico ($\%CI$). Los parámetros resultantes del análisis BEST está marcado con un asterisco (*).

4.2.10 Estudio de la diversidad vírica durante el proceso de compostaje mediante análisis de secuenciación masiva

- *Determinación de la presencia de virus mediante microscopía electrónica de transmisión*

En un primer análisis, la comunidad vírica, se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (del inglés: Transmission electronic microscopy; TEM) en

distintas fases del proceso y en el lodo de partida. Las imágenes obtenidas se recogen en el Anexo III. A pesar de la amplia diversidad mostrada mediante microscopía, los resultados de la secuenciación mediante Illumina HiSeqs no fueron los esperados, aunque se confirmó la presencia de distintas familias de virus como los *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Retroviridae* y virus no clasificados (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta estos resultados y con objeto de analizar la evolución de la comunidad vírica, se seleccionaron tres muestras correspondientes al lodo y a los días 14 (fase bajo cubierta) y 70 (fase maduración) del compostaje, para realizar un nuevo estudio. La fracción de virus fue previamente concentrada siguiendo la misma metodología que en el primer análisis con PEG y analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Al igual que en el primer análisis, se vio una amplia diversidad morfológica de partículas virales, como se muestra en la figura 4.22, 4.23 y 4.24.

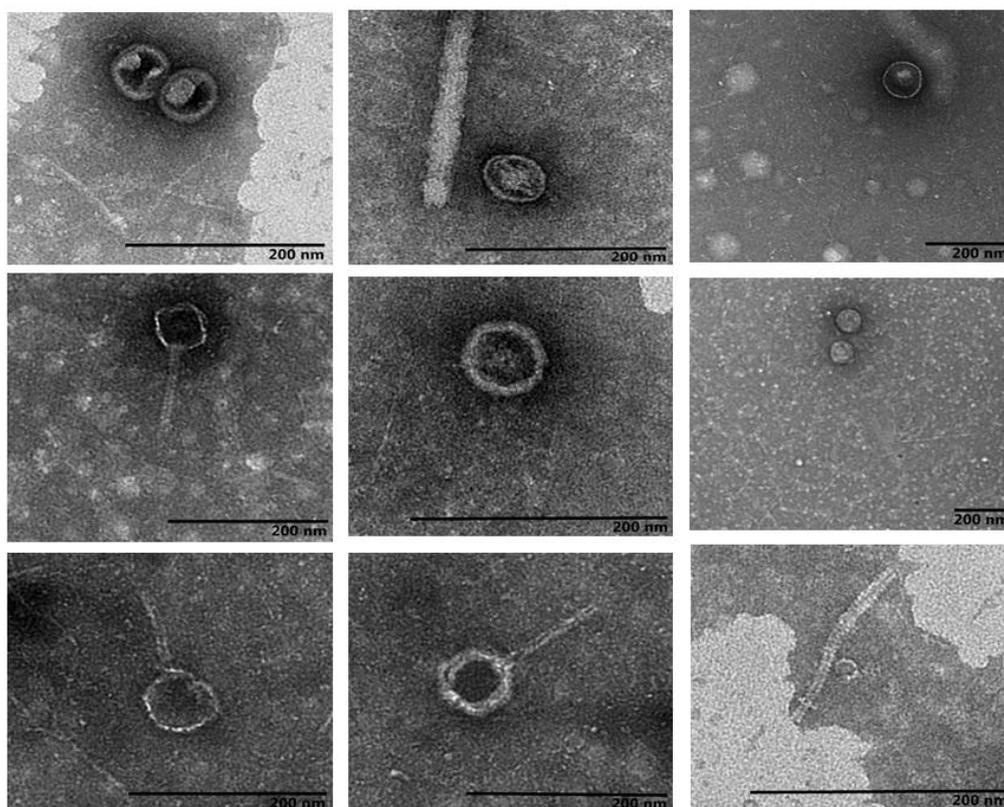


Figura 4.22. Fotografías de las diversas morfologías de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión en el lodo de la Pila II (la línea de la escala corresponde a 200 nm).

Tal y como se muestra en las correspondientes figuras, se pueden diferenciar estructuras circulares, filamentosas e icosaédricas. Estas morfologías coinciden con las imágenes recogidas en otros estudios, como el de Cantalupo y colaboradores (2011), donde se analizó la diversidad de virus de lodos de depuradoras. Las morfologías icosaédricas y filamentosas se asemejan a las estructuras descritas en el estudio de Rosario y colaboradores (2009) y Colombet y colaboradores (2007) en aguas residuales y sistemas acuáticos, quienes los describen como estructuras compatibles con bacteriófagos y agentes patógenos de plantas. Las estructuras de bacteriófagos con simetría binaria (cabeza icosaédrica y cola no contráctil) se observaron en todas las muestras analizadas.

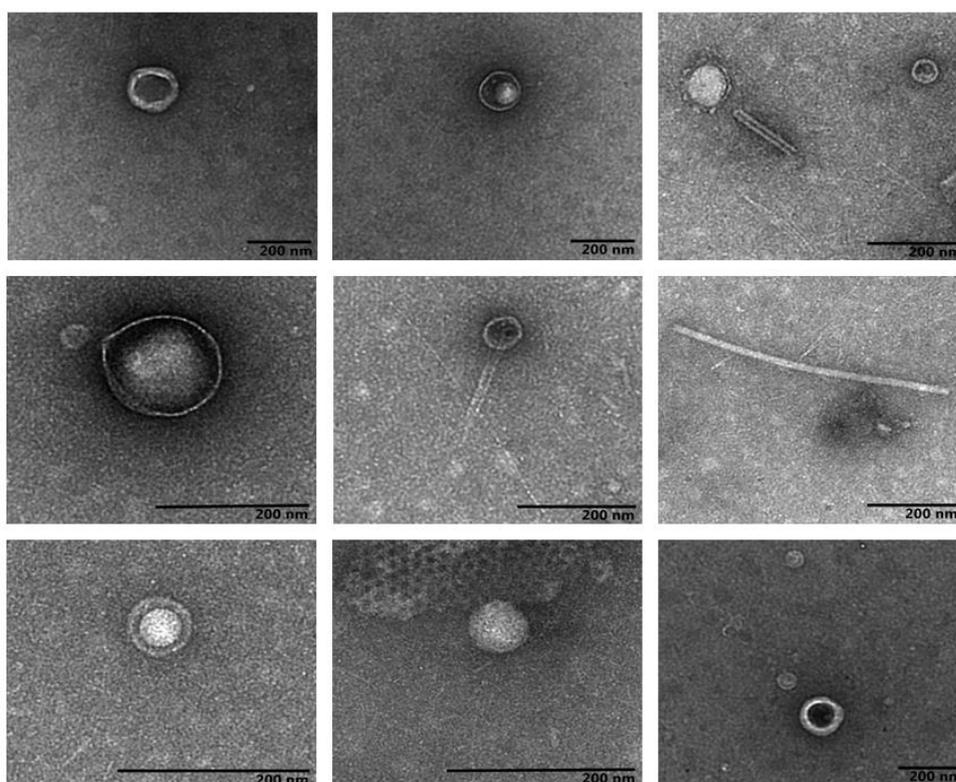


Figura 4.23. Fotografías de las diversas morfologías de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión a los 14 días del proceso de compostaje de la Pila II (la línea de la escala corresponde a 200 nm).

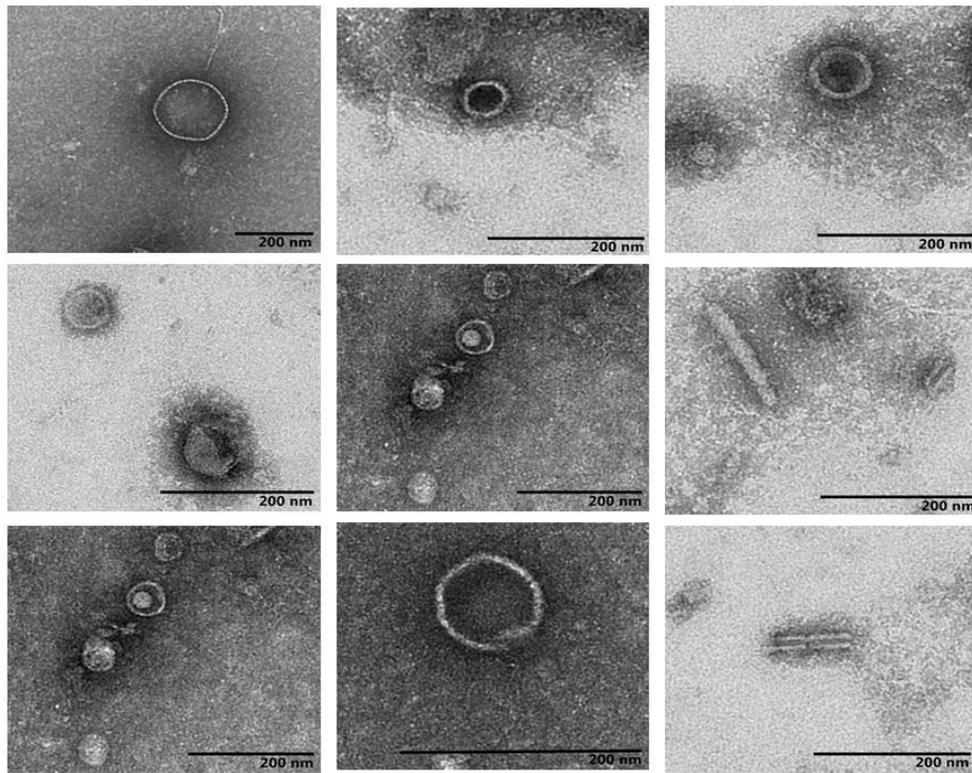


Figura 4.24. Fotografías de las diversas morfologías de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión a los 70 días del proceso de compostaje de la Pila II (la línea de la escala corresponde a 200 nm).

• *Distribución de la comunidad vírica mediante Ion Torrent*

Los resultados de las abundancias relativas obtenidas de las secuencias mediante Ion Torrent se recoge en la figura 4.25. Estos análisis mostraron una evolución de las comunidades víricas a lo largo del proceso.

En general, los mayores porcentajes correspondieron a los virus de plantas, en especial los asociados al tomate, pimiento o pepino, incluso en las muestras de lodo. Los virus específicos de aves no se detectaron en las muestras correspondientes al lodo y aparcieron en la muestra de 14 días, incrementando su abundancia a los 70 días. Por otro lado, fue notable el incremento gradual, desde el 8% al 22%, en el porcentaje de bacteriófagos detectado en las muestras analizadas.

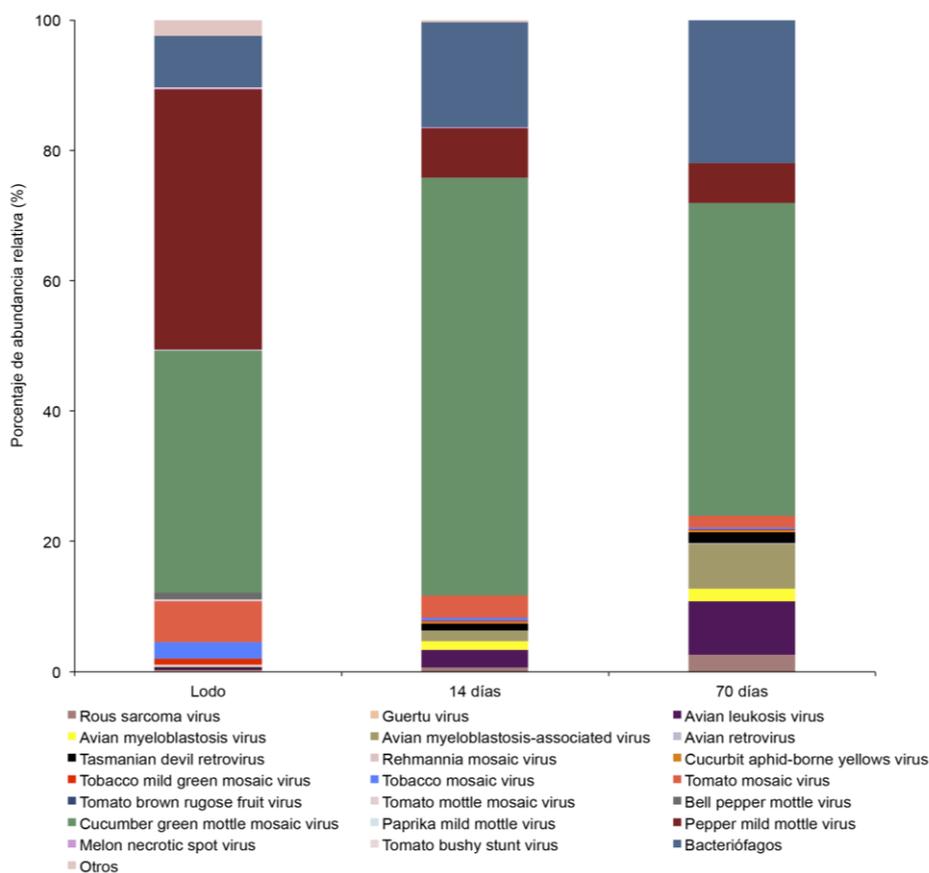


Figura 4.25. Porcentaje de abundancia relativa de la comunidad vírica en las muestra del lodo, tiempo 14 y tiempo 70, de la Pila II mediante secuenciación masiva con Ion Torrent.

Las figuras 4.26, 4.27 y 4.28 muestran la asignación taxonómica de cada una de las muestras analizadas, donde puede observarse una disminución de la diversidad al final de proceso. la muestra del lodo tuvo una amplia diversidad, con un perfil similar a la muestra a los 14 días; mientras que la menor diversidad correspondió a los 70 días.

Entre los virus más abundantes destacaron el virus del mosaico y moteado verde del pepino (CGMMV), con una abundancia del 37, 64 y 47% en el lodo, tiempo 14 y 70, respectivamente y el virus del mosaico y moteado del pimiento (PMMoV), con un 49, 7 y 6% de abundancia, correspondiente al lodo, 14 y 70 días. Como puede observarse, el proceso de compostaje parece haber favorecido la reducción del virus PMMoV, mientras que CGMMV mantuvo niveles de población más estable. El CGMMV pertenece al grupo de los *Tobamovirus* y es considerado el mayor patógeno de cultivos de la familia *Cucurbitaceae* en todo el mundo (Darzi *et al.*, 2017). El PMMoV ha sido propuesto como un posible indicador fecal en el agua, ya que su fuente primaria son las heces humanas y se consideran uno de los virus más abundantes, llegando a detectarse hasta 10^5 – 10^{10} copias g^{-1} de heces (Hamza *et al.*, 2011; Kuroda *et al.*, 2015).

Otro virus de plantas con altos porcentajes de abundancia fue el virus del mosaico del tomate (ToMV), aunque su tendencia fue la de decrecer a lo largo del proceso. Los cultivos principales a los que afectan estos virus son el tomate, pepino y pimiento, siendo los insectos los vectores más frecuentes. La eliminación de este virus en procesos de compostaje ha sido evidenciada en estudios de Avgelis y Manios (1989) mediante inactivación por temperaturas. En nuestro estudio, se detectó una disminución a lo largo de la etapa de maduración. Sin embargo, el análisis de muestras correspondientes a periodos más avanzados del proceso (tiempo 120) podrían confirmar la capacidad de este compostaje de eliminar o controlar virus ToMV.

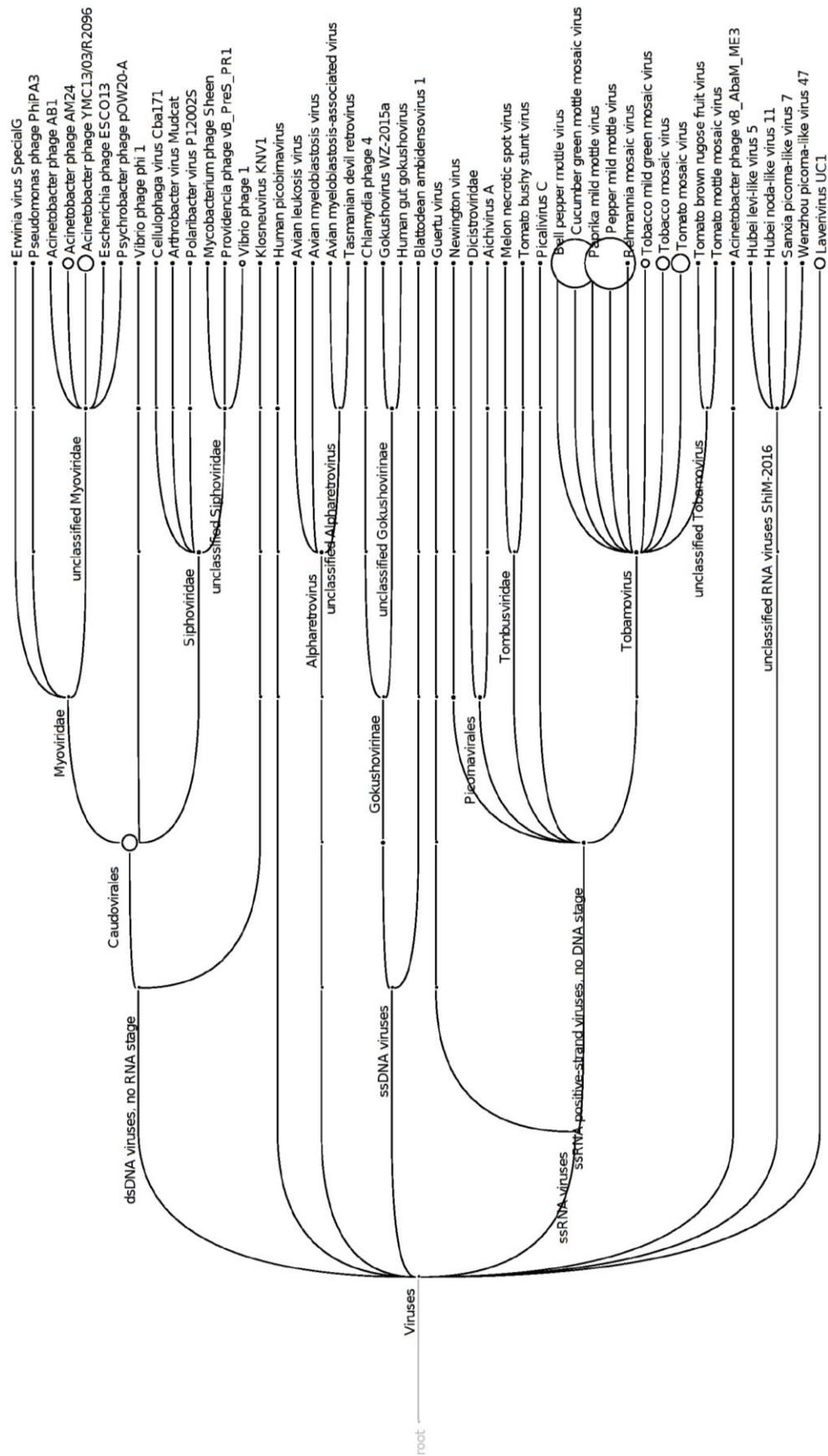
En lo que respecta a las muestras del lodo, se detectó un gran número de representantes de los taxones *Picornavirales*, *Tombuviridae* y *Tobamovirus*, correspondientes mayoritariamente a virus fitopatógenos. La estructura morfológica de estos virus corresponden a las visualizadas mediante TEM con las estructuras circulares de menor tamaño.

Caudovirales es otro de los grupos destacados en el lodo, representado por los virus pertenecientes a la familia *Myoviridae*. La morfología de esta familia coincide también con las visualizadas mediante TEM, correspondiente a las estructuras hexagonales, en las que también se pueden distinguir la cola característica de los bacteriófagos: en el caso de los *Myoviridae*, una cola contráctil y en el caso de los *Siphoviridae*, una cola más larga no contráctil (Ackermann, 2001). En el lodo predominaron representantes de virus de bacterias entéricas, como el colifago ESCO13, el enterofago HK629, el virus Newington (fago de *Salmonella*), el fago vB_PreS_PR1 (fago de *Providencia*), así como los bacteriófagos de los géneros *Acinetobacter* y *Mycobacterium*, destacando una menor diversidad que los identificados durante el proceso de compostaje.

En cuanto a virus animales, se identificaron algunos causantes de enfermedades en aves, como el virus de mieloblastosis o leucosis aviar. Entre los virus humanos, se detectaron *Picobirnavirus* humanos, generalmente causantes de problemas gastrointestinales, como el Aichi virus (Le Guyader *et al.*, 2008).

En las muestras del tiempo 14 (Fig.4.27), es destacable la mayor diversidad de los bacteriófagos que podría relacionarse con la mayor diversidad bacteriana correspondiente a este mismo tiempo de proceso. Los bacteriófagos identificados son específicos de los géneros *Geobacillus*, *Mycobacterium*, *Thermobifida*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Streptococcus* (Fig. 4.27). Muchos de estos géneros pertenecen a los órdenes predominantes del proceso: *Actinomycetales* y *Bacillales*. Por otro lado, en lo que respecta al género *Bacillus*, indicar que aunque no se han identificado bacteriófagos específicos de este género, sí se han identificado secuencias correspondientes a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*. Gillis y Mahillon (2014), describieron que un gran número de bacteriófagos de *Bacillus* pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Tectiviridae*.

A este tiempo se detectaron muchos virus animales, similares a la muestra del lodo y también el grupo *Picornaviridae*, relacionado en estudios epidemiológicos con gastroenteritis en humanos y animales (Rosen, 2003).



4.26. Árbol de asignación taxonómica de la comunidad vírica en la muestra del lodo de la Pila II obtenida mediante Ion Torrent.

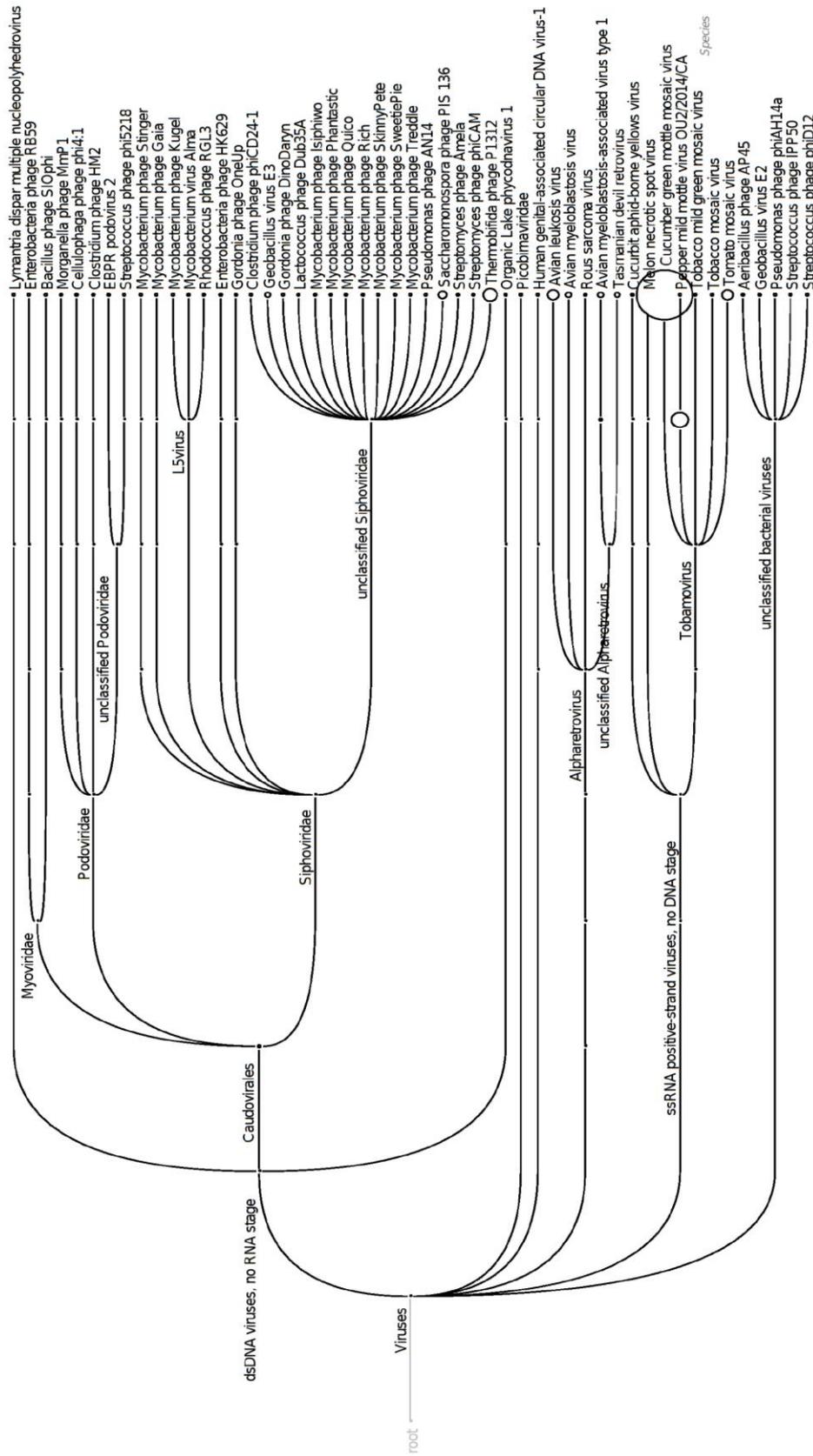
Por otro lado, en las muestras correspondientes al tiempo 70, se observó un incremento de fagos específicos de *Saccharomonospora* (Fig 4.25 y Fig. 4.28), género bacteriano perteneciente a *Actinomycetales*, que fue uno de los órdenes predominantes detectado mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo. Este hecho pone de manifiesto la estrecha relación existente entre las poblaciones de fagos y bacterias y el papel que pueden desempeñar los bacteriófagos en el control de las poblaciones bacterianas.

Como se ha mencionado con anterioridad, la muestra del tiempo 70 tuvo menor diversidad. Este hecho se puede visualizar más claramente en la figura 4.28. Los bacteriófagos siguieron presentes en esta muestra, con fagos de *Acinetobacter* y *Streptococcus* e incluso, como en el caso del tiempo 14, con representantes de microorganismos termófilos, probablemente debido a las altas temperaturas detectadas también en la fase de maduración. El virus de la leucosis y mieloblastosis aviar también estuvieron presentes en este tiempo.

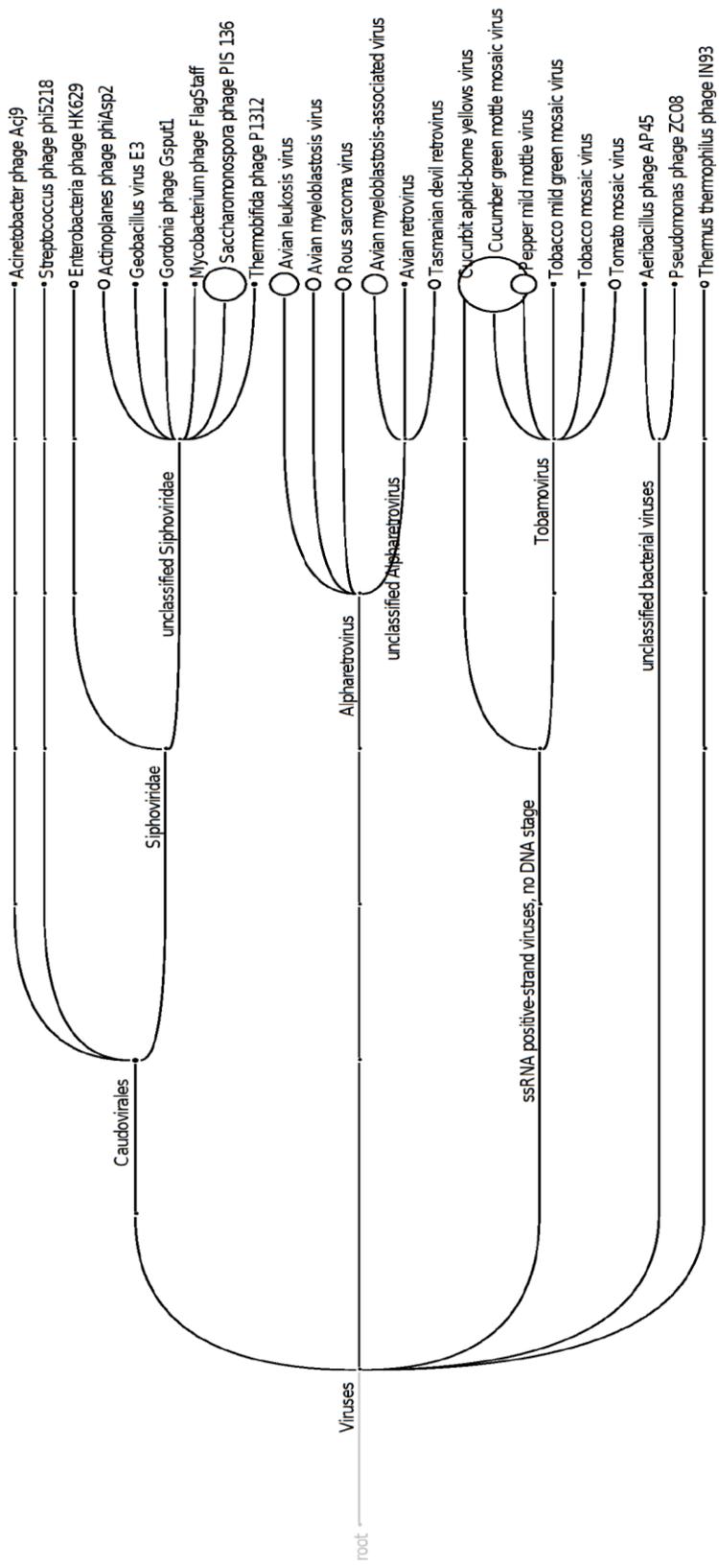
Otro de los grupos destacados en todas las muestras fue *Alpharetrovirus* y donde se encuadran los virus eucariotas, como el caso del virus Avian leukosis y Avian mieloblastosis y el virus del sarcoma de Rous (RSV), que pueden tener afección en aves, sobre todo en la industria avícola. Además, el RSV fue el primero en ser correlacionado con la formación de tumores (Gao *et al.*, 2015).

Los virus identificados en la fase de maduración, a los 70 días, fueron principalmente bacteriófagos y virus de plantas, por lo que el proceso de compostaje en la fase de maduración sería efectivo para la eliminación de virus humanos en particular, virus causantes de enfermedades gastrointestinales, así como en la reducción de algunos virus fitopatógenos.

Los resultados de la distribución de virus en las muestras secuenciadas están en consonancia con los datos aportados previamente por Bibby y colaboradores (2011), donde los virus eucariotas fueron superiores a los bacteriófagos, en porcentaje de abundancia relativa.



4.27. Árbol de asignación taxonómica de la comunidad vírica en la muestra correspondiente a los 14 días de la Pila II obtenida mediante Ion Torrent.



Species

Figura 4.28. Árbol de asignación taxonómica de la comunidad vírica en la muestra correspondiente a los 70 días de la Pila II obtenida mediante Ion Torrent.

4.3 Estudio de cepas de interés biotecnológico para la obtención de enzimas extracelulares

En este estudio se realizó un cribado cualitativo con los aislados de la Pila II, tanto bacterias como hongos, para determinar su capacidad para producir enzimas extracelulares de interés biotecnológico. Se determinaron las enzimas amonificantes y solubilizadoras de fosfato, así como las actividades hidrolíticas: amilasa, lipasa, proteasa, pectinasa, hemicelulasa y celulosa y actividades oxidoreductasas como la lacasa, tirosinasa, polifenol oxidasas y peroxidasa, empleando técnicas colorimétricas tal y como se describe en el apartado 3.8 de Materiales y Métodos.

4.3.1 Producción de enzimas extracelulares en las bacterias aisladas en el proceso del compostaje

Se aislaron un total de 128 cepas bacterianas durante el proceso de compostaje. A cada cepa se le asignó un código en función de la muestra de procedencia y la temperatura a la que fue aislada. Considerando, el origen de la cepa y el número de enzimas producidas, se seleccionaron 34 cepas para su posterior identificación mediante la secuenciación del gen ARNr 16S, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5.2.

La distribución taxonómica de los aislados seleccionados para su identificación se muestra en la figura 4.29a. El mayor número de cepas pertenecieron al orden *Bacillales*, seguido de *Pseudomonadales*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este mismo estudio mediante técnicas independientes de cultivo (Fig. 4.15) y donde se puso de manifiesto que los órdenes *Bacillales* y *Actinomycetales* eran predominantes en varias etapas del proceso.

La distribución relativa de las actividades detectadas en base al número de cepas se muestra en la figura 4.29b. De todas las actividades enzimáticas analizadas, las peroxidasas fueron las más frecuentes, seguidas de las polifenol oxidasas. La actividad amonificante también fue destacada, ya que se observó en más del 50% de las cepas analizadas. El resto de actividades fueron menos frecuentes, pero mostraron resultados positivos en un número notable de cepas, como las hemicelulasas o proteasas.

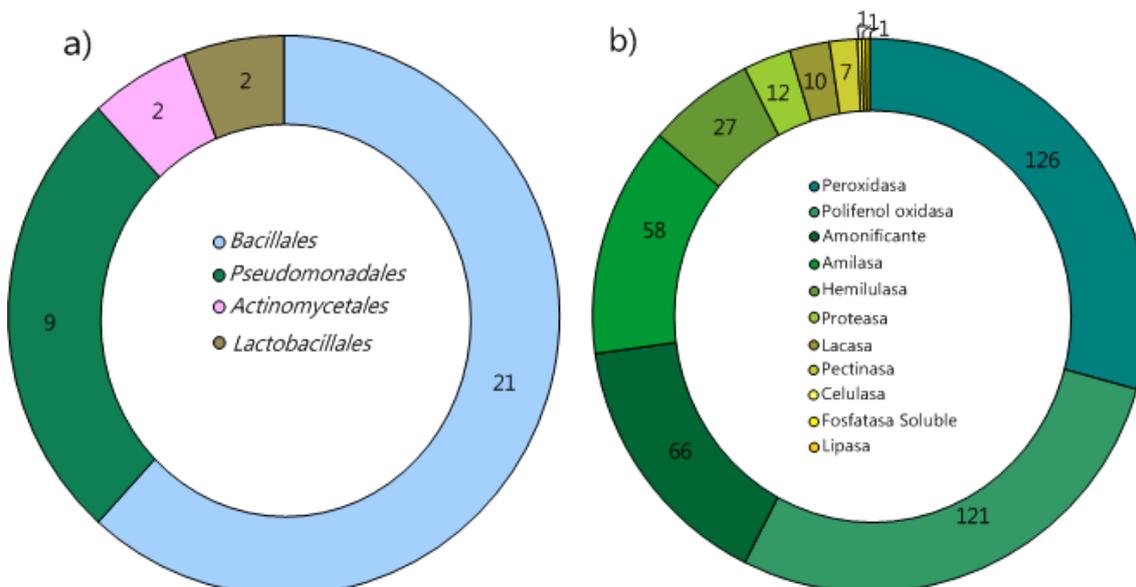


Figura 4.29. Frecuencia de enzimas extracelulares producidas por las cepas bacterianas aisladas del proceso de compostaje de la Pila II: Distribución taxonómica de las bacterias aisladas e identificadas a nivel de orden (a) y distribución de las enzimas producidas por las cepas bacterianas aisladas. Los números indican el número de cepas bacterianas productoras de la enzima correspondiente (b).

Los resultados obtenidos (Fig. 4.29a) mostraron que, de las 34 cepas identificadas, 21 pertenecieron al orden *Bacillales*, siendo la mayoría pertenecientes al género *Bacillus* y mostrando una gran diversidad de actividades extracelulares. Las especies del género *Bacillus* son conocidas por su capacidad para resistir altas temperaturas, en parte debido a su capacidad para formar esporas. Este género ha sido ampliamente descrito como un género predominante en procesos de compostaje, capaz de producir enzimas extracelulares a temperaturas de 50 °C (Wang *et al.*, 2018). Estas características hacen que se postule como un candidato de interés biotecnológico y con un papel relevante en este proceso

El perfil de las actividades extracelulares de cada una de las cepas bacterianas aisladas (Tabla 4.13) mostró que, aquellas procedentes de la muestra del lodo y del estructurante presentaron un mayor número de actividades que las cepas procedentes del resto de muestras, detectándose 29 y 25 actividades positivas, respectivamente.

En las cepas obtenidas en los primeros tiempos de compostaje 0, 1 y 2 días, destacaron principalmente las actividades amilolítica y hemicelulolítica. En los tiempos sucesivos y hasta el final del proceso, se aislaron un mayor número de cepas (entre 10 y 20 según el tiempo) con un predominio de las actividades amilolítica y amonificante.

Las actividades lignocelulolíticas, peroxidasas y fenol oxidasas, se detectaron en casi todos estos aislados, lo que sugiere que durante el proceso de compostaje predominan microorganismos degradadores de compuestos recalcitrantes y macromoléculas de difícil degradación como la lignina. Estas enzimas son muy inespecíficas y son secretadas por bacterias y hongos, principalmente microorganismos ligninolíticos. Dada su inespecificidad, se ha documentado que están implicadas en la degradación de numerosos compuestos aromáticos, cuya similitud con los constituyentes de la lignina permite esta transformación. Entre ellos se incluyen compuestos xenobióticos como los colorantes textiles, BTEX, hidrocarburos policíclicos aromáticos y contaminantes emergentes (Ellouze y Sayadi, 2016; Oliveira *et al.*, 2009).

Tabla 4.13. Producción de actividades enzimáticas extracelulares, identificación filogenética, porcentaje de identidad y número de acceso en el GenBank de las bacterias aisladas en la Pila II. (Positivo ■ Negativo □).

Muestra/tiempo de muestreo	Nombre aislado	Hidrolíticas						Lignocelulosa						Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso Gen Bank
		Peptidasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa	Peroxidasa	Fenol oxidasa			
Lodo	BM02	■	■	□	□	■	□	■	■	□	□	■	■	<i>B. pumilus</i>	>99	KY085970.1
	BM03	□	■	□	□	■	□	■	■	□	□	■	■			
	BM04	□	■	□	□	■	□	■	■	□	□	■	■			
	BM05	■	■	□	□	■	□	■	■	□	□	■	■	<i>B. pumilus</i>	>99	JX860616.1
	BM06	□	■	□	□	■	□	■	■	□	□	■	■			
	BT01	□	■	□	□	■	□	■	■	□	□	■	■	<i>B. paralicheniformis</i>	>99	MG651169.1

Muestra/tiempo de muestreo	Nombre aislado	Hidrolíticas						Lignocelulosa						Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso GenBank	
		Peptidasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa	Peroxidasa	Fenol oxidasa				
Estructurante	BM07																
	BM08														<i>E. faecium</i>	>99	CP025077.1
	BM09																
	BM12																
	BM13																
	BT02														<i>B. pumilus</i>	>99	JX860616.1
	BT03																
0	BM15																
	BM18																
	BM20													<i>B. stratosphericus</i>	>99	KY797998.1	
	BM22																
	BT04													<i>B. paralicheniformis</i>	>99	MF928386.1	
	BT05																
1	BM23																
	BM24																
	BM25													<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	>99	JN644504.1	
	BT06																
	BT07																
	BT08													<i>E. faecium</i>	>99	CP025077.1	
	BT09													<i>B. stratosphericus</i>	>99	KY797998.1	
	BT11																
2	BM29																
	BT12																
	BT16													<i>B. licheniformis</i>	>99	MG546213.1	
	BT18													<i>B. paralicheniformis</i>	>99	MG651169.1	
	BT19																

Muestra/tiempo de muestreo	Nombre aislado	Hidrolíticas					Lignocelulosa					Identificación filogenética	% de indentidad	N° de acceso Gen Bank	
		Peptidasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa				Peroxidasa
5	BM34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. safensis</i>	>99	CP018100.1
	BM36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. mojavenensis</i>	>99	MF040286.1
	BM41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BT20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BT22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BT23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. beijingensis</i>	>99	NR_117988.1
	BT27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
8	BM43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. stratosphericus</i>	>99	KY797998.1
	BM45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. beijingensis</i>	>99	NR_117988.1
	BM52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BM57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	BT29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. paralicheniformis</i>	>99	MG651169.1
BT30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>B. paralicheniformis</i>	>99	CP023168.1	
BT32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
BT34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

Muestra/tiempo de muestreo	Nombre aislado	Hidrolíticas						Lignocelulosa						Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso GenBank	
		Peptidasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa	Peroxidasa	Fenol oxidasa				
14	BM60													<i>V. halodenitrificans</i>	>99	CP017962.1	
	BM61																
	BM62																
	BM63																
	BM64																
	BM65														<i>V. halodenitrificans</i>	>99	CP017962.1
	BM66																
	BM67																
	BT37														<i>B.slicheniformis</i>	>99	MG593200.1
	BT43																
30	BM70													<i>S. flexibilis*</i>	>97	KP973996.1	
	BM71																
	BM73													<i>B. paralicheniformis</i>	>99	CP023168.1	
	BM74																
	BM75																
	BM76																
	BM80																
	BT47													<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1	
	BT51																
	BT57													<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1	
BT59																	

Muestra/tiempo de muestreo	Nombre aislado	Hidrolíticas						Lignocelulosa						Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso Gen Bank	
		Peptidasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa	Peroxidasa	Fenol oxidasa				
40	BM85														<i>C. glutamicum</i>	>99	CP013991.1
	BM86																
	BM87																
	BM88																
	BM89																
	BM90																
	BM92																
	BT64														<i>B. mojavenis</i>	>99	KY131800.1
	BT67																
	BT68																
70	BM94																
	BM95																
	BM96														<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1
	BM97																
	BM98																
	BM99																
	BM100														<i>P. pulmonis</i>	>99	KU364016.1
	BM101																
	BM102																
	BM103																
	BT70																
	BT72																
	BT75																
	BT76																
BT77																	
BT78																	

Muestra/tiempo de muestreo	Nombre aislado	Hidrolíticas						Lignocelulosa					Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso GenBank	
		Peptidasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa	Peroxidasa				Fenol oxidasa
120	BM10 5															
	BM10 6													<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1
	BM10 7															
	BM10 8															
	BM10 9															
	BM11 0													<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1
	BM11 1															
	BM11 2															
	BM11 3															
	BM11 4															
	BM11 5															
	BM11 6															
	BM11 7															
	BT79															
	BT80															
	BT82															
	BT84															
	BT86															
	BT87													<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1
	BT88													<i>P. formosensis</i>	>99	NR_118141.1

En particular, *B. pumilus*, BM02, BM05 y BT02 mostraron entre 6 y 7 actividades enzimáticas (proteasas, amilasas, pectinasas, hemicelulasas, peroxidasas y polifenol oxidasas). Estos resultados coinciden con previos estudios realizados con *B. licheniformis* y *B. pumilus*, descritas como productoras de polifenol oxidasa y peroxidasas (Mohammad y Alireza, 2007). En el caso de *B. pumilus* BM02, también se detectó actividad amonificante. Estas cepas mostraron un amplio perfil metabólico y previamente han sido caracterizadas por su capacidad para producir peroxidasas y proteasas, en el caso de las proteasas a distintas temperaturas y pH lo que incrementa su aplicación biotecnológica (Kumar, 2002; Oliveira *et al.*, 2009).

Las cepas de *B. paralicheniformis* (BT01, BT04, BT18, BT29, BT30 y BM73) mostraron un perfil enzimático similar, con resultados positivos en la actividad amilasa, amonificante, peroxidasa y polifenol oxidasa. Sin embargo, sólo la cepa BT04 mostró actividad hemicelulolítica. Esta especie ha sido descrita recientemente y su aislamiento se hizo en pasta de soja fermentada, un medio lignocelulósico donde se propicia la secreción de este tipo de enzimas y que permite su aplicación en la degradación de este material (Dunlap *et al.*, 2015).

B. stratosphericus BM20, BT09 y BM43 mostraron un perfil enzimático diferente, aunque todas mostraron resultados positivos para la actividad proteasa, peroxidasa y polifenol oxidasa, con diferencias entre ellas en cuanto a la producción de amilasas, actividad amonificante y hemicelulolítica.

B. licheniformis BT16 y BT37 mostraron resultados positivos para las actividades hidrolíticas amilasa y amonificante, datos que concuerdan con resultados obtenidos en cepas de este género y aisladas en un proceso de compostaje de material lignocelulósico (Jurado *et al.*, 2014) donde además, fue una especie propuesta como candidato para procesos de bioaumentación. *B. licheniformis* BT37 fue la única cepa donde se detectó actividad fosfatasa soluble, de acuerdo con la bibliografía, algunas cepas de este género son capaces de producir fosfatasas alcalinas siendo su mayor producción a pH 7 y temperaturas 45 °C (Glynn *et al.*, 1977; Pandey y Banik, 2011). Además, *B. licheniformis* se ha considerado como una bacteria segura, (del inglés, GRAS: generally

regarded as safe), por lo que es ampliamente utilizada a escala industrial para la producción de exoenzimas (Parrado *et al.*, 2014).

B. mojavensis BM40 y BT64 mostraron resultados positivos en actividad amilasa, hemicelulasa y celulasa. La eficiencia de *B. mojavensis* ha sido demostrada en la producción de diferentes enzimas como la amilasa y proteasa a temperaturas termófilas (Hammami *et al.*, 2018) y en otros estudios también se ha determinado su capacidad para producir otras actividades ligninolíticas, como la xilanasa (Akhavan Sepahy *et al.*, 2011; Fatokun *et al.*, 2016).

El resto de cepas identificadas, pertenecieron al orden *Actinomycetales* y *Lactobacillales*. Dentro del orden *Actinomycetales*, *Arrobacter creatinolyticus* BM25 y *Corynebacterium glutaminicum* BM85 mostraron entre 3 y 4 actividades. Dentro del orden *Lactobacillales*, las 2 cepas identificadas pertenecieron a *Enterococcus faecium* (BM08 y BT08) con 4 y 5 actividades, respectivamente. Este género ha sido ampliamente descrito en suelos y aguas y es incluso capaz de degradar compuestos aromáticos (Shen *et al.*, 2012).

4.3.2 Cuantificación de la producción proteasa en las cepas bacterianas identificadas

Los resultados obtenidos del cribado cualitativo mostraron un gran número de cepas bacterianas productoras de proteasa, seleccionándose aquéllas que mostraron resultados positivos. Las proteasas son una de las enzimas más importantes por su aplicación biotecnológica ya que se usan ampliamente en la industria farmacéutica, textil, alimentaria, papelera, y química o en el tratamiento de aguas, entre otras (Jegannathan y Nielsen, 2013; Schallmey *et al.*, 2004). Esta enzima se detectó en 10 de las cepas identificadas, principalmente en el género *Bacillus* (BM05, BT02, BM20, BT09, BM34, BM02 y BM43), *Pseudomonas formosensis* BT87 y BT88 y *Serpens flexibilis* BT70.

Estudios previos sobre la producción de proteasas por bacterias, han demostrado la influencia de parámetros como el pH y la temperatura en su producción (Arulmani *et al.*, 2007; Nehete *et al.*, 1985). Para analizar las variaciones en la secreción de proteasa en base a la temperatura, se consideraron tres temperaturas 30, 37 y 50 °C. La figura

4.30 muestra las unidades de enzima (U) en función de la biomasa bacteriana expresadas como unidades formadoras de colonias (UFC) para cada una de las cepas estudiadas.

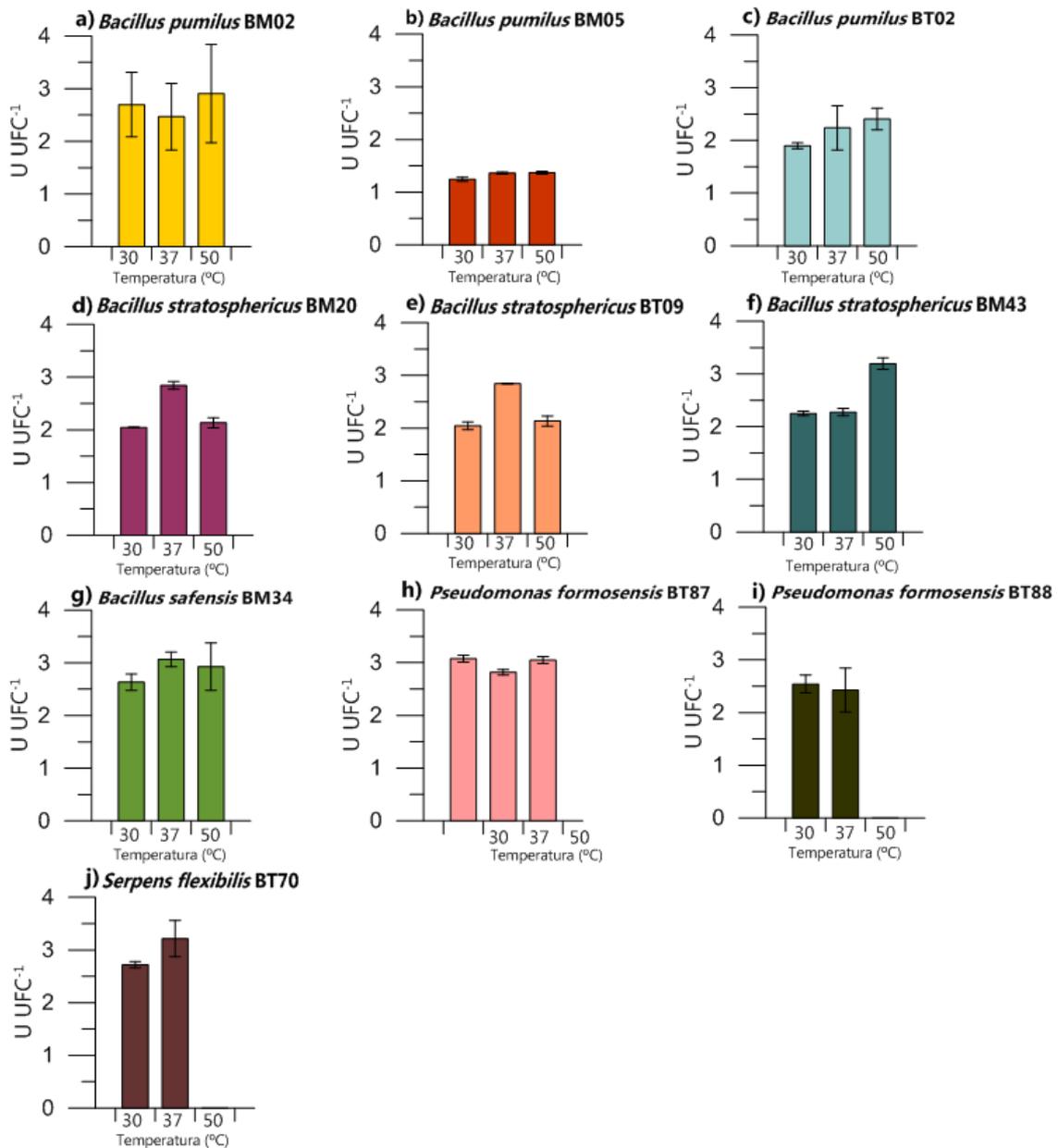


Figura 4.30. Cuantificación del efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa en distintas cepas bacterianas: *Bacillus pumilus* BM02 (a), *Bacillus pumilus* BM05 (b), *Bacillus pumilus* BMT02 (c), *Bacillus stratosphericus* BM20 (d), *Bacillus stratosphericus* BT09 (e), *Bacillus stratosphericus* BM43 (f), *Bacillus safensis* BM34 (g), *Pseudomonas formosensis* BT87 (h), *Pseudomonas formosensis* BT88 (i), *Serpens flexibilis* BT70 (j) Los resultados se muestran en función de la producción de unidades de enzima por unidades formadoras de colonias (U UFC⁻¹). Las barras de error representan la desviación estándar obtenido a partir de tres réplicas independientes (n=3).

Las cepas de *Bacillus pumillus* BM02, BM05 y BT02 (Fig. 4.30a-c), no mostraron diferencias significativas en cuanto a las distintas temperaturas para la producción de proteasas.

La figuras 4.30d-f, muestran la producción de enzima proteasa por distintas cepas de *Bacillus stratosphericus*. En este caso, la producción de proteasa en las cepas BM20 y BT09 tuvo una producción muy similar, siendo su temperatura de mayor producción a 37 °C. Por el contrario, *B. stratosphericus* BM43 fue la cepa con mayor producción a los 50 °C con valores de 3 U UFC⁻¹.

En *B. safensis* BM34 (Fig. 4.30g) se determinaron valores de proteasas entre 2.5 y 3 U UFC¹, aunque no se observaron diferencias significativas en función de la temperatura. Diversos autores han descrito cepas pertenecientes a esta especie como importantes productoras de proteasas, siendo por tanto un candidato para su aplicación en la industria biotecnológica, concretamente como aditivo para detergentes comerciales debido a su rango óptimo de temperatura y a que no se ha demostrado ninguna patogenicidad relacionada con la biología de esta especie (Jalkute *et al.*, 2017; Mhamdi *et al.*, 2017).

En el caso de *Pseudomonas formosensis* BT87 (Fig. 4.30h), no se observaron diferencias significativas en el efecto de la temperatura en la actividad proteasa. La cepa BT88 (Fig. 4.30i) no creció a 50 °C, y tuvo una producción menor que la cepa BT87. *P. formosensis* es un microorganismo aerobio gram negativo que ha sido previamente aislado en procesos de compostaje, concretamente de residuos alimentarios. Los resultados obtenidos en *P. formosensis* varían en ambas cepas, mostrando termotolerancia a elevadas temperaturas en BT88, mientras que en BT87, aparece la máxima producción enzimática a 30 °C, lo cual indica la diversidad dentro de la especie al poder crecer en un amplio rango de temperaturas (30-50 °C) (Lin *et al.*, 2013).

Serpens flexibilis BT70 (Fig. 4.30j), no presentó crecimiento a los 50 °C y su producción se situó en valores cercanos a 3 U UFC¹, sin diferencias significativas en la producción a distintas temperaturas. Esta bacteria aeróbica ha sido recientemente

propuesta como *Pseudomonas flexibilis*, una bacteria que puede crecer en un rango de temperaturas hasta los 45 °C (Shin *et al.*, 2015).

4.3.3 Producción de enzimas extracelulares en los hongos aislados en el proceso del compostaje

Durante el compostaje de la Pila II se llevó a cabo el aislamiento de los hongos en las distintas fases del proceso. En total se aislaron e identificaron 40 hongos, los cuales se sometieron al mismo cribado enzimático que las cepas bacterianas. En este caso, dado el número reducido de hongos, todos se identificaron mediante secuenciación, como se describe en el apartado de Material y Métodos 3.5.3.

La diversidad de los hongos cultivables se resume en la Figura 4.31a. El mayor número de aislados pertenecieron al orden *Eurotiales*, con más del 37%, seguido por *Microascales* con 15% aislados y *Mucorales* con 12% aislados. El orden *Mucorales* e *Hypocreales* también tuvo representación con un 12 y 10%, respectivamente. En menor representación estuvo el orden *Capnoidales* con el 7% de representación, seguido de *Agaricales* y *Sporidiobolales* con porcentajes próximos al 5%. Los órdenes *Sordariales*, *Saccharomycetales*, *Trichosporales* y *Polyporales* tuvieron una representación ligeramente superior al 2%.

Los resultados obtenidos de la distribución de actividades enzimáticas en base al número de hongos aislados (Fig. 4.31b), mostraron que las actividades más frecuentes fueron las actividades amilasa (72%), peroxidasa (48%), polifenol oxidasa (42%), pectinasa (42%), celulasa (22%) y lacasa (15%).

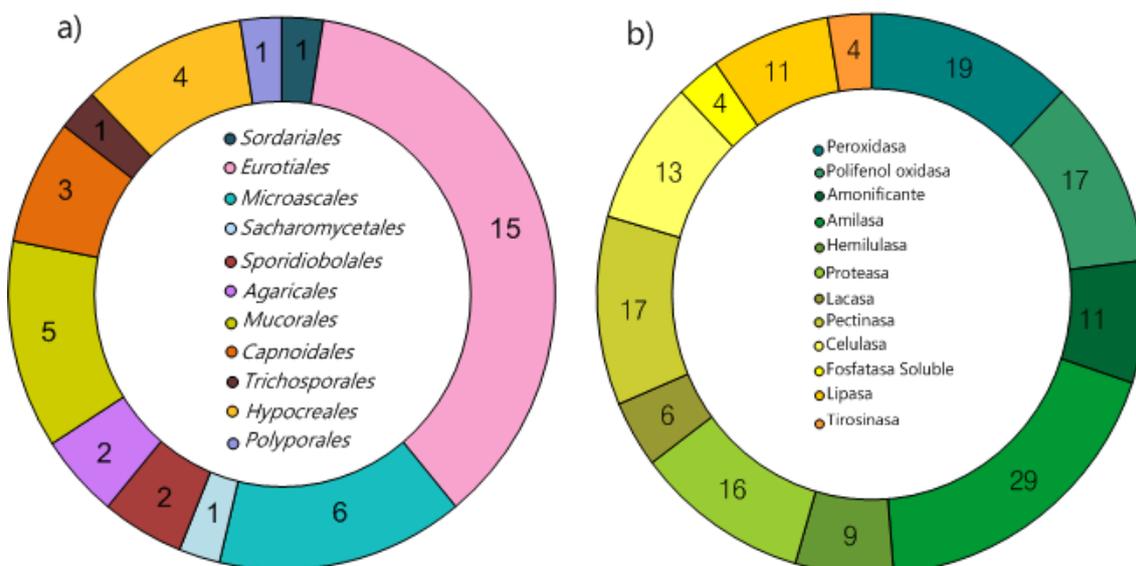


Figura 4.31. Frecuencia de enzimas extracelulares producidas por las cepas fúngicas aisladas del proceso de compostaje de la Pilla II. Distribución taxonómica de los hongos aislados e identificados a nivel de orden (a) y distribución de las enzimas producidas por las cepas fúngicas aisladas. Los números indican el número de cepas bacterianas productoras de la enzima correspondiente (b).

En la tabla 4.14 se detallan cada una de las actividades producidas por los hongos aislados. Se observó una sucesión de la población fúngica cultivable con un cambio en los órdenes pertenecientes a las primeras fases del proceso (tiempo 0, 1, 2, 5 y 8) con respecto a las fases más avanzadas bajo cubierta (tiempo 15 y 30) y a la fase de maduración (tiempo 70 y 120 días).

En la fase inicial del compostaje hubo un predominio de los órdenes *Sporidiobolales*, *Saccharomycetales* y *Agaricales*. Durante la fase bajo cubierta más avanzada, hubo un predominio de los órdenes *Capnoidales*, *Trichosporales* y *Mucorales*. En la etapa de maduración, los aislados más representativos fueron los pertenecientes a los órdenes *Hypocrales*, *Sordariales* y *Polyporales*. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de los órdenes *Eurotiales* y *Microascales* a lo largo de todo el proceso.

Los resultados obtenidos (Tabla 4.14) mostraron que un 27% de los hongos presentaron 6 actividades o más. Entre estos destacaron *Scopulariopsis brevicaulis* HM03, HM43, HM56, HM57 y HT17, en los que, excepto la cepa HM43, el resto

mostraron resultados positivos para la actividad amilolítica, pectinolítica, hemicelulolítica, y celulolítica. En el caso de la cepa HM03, también mostró actividad peroxidasa y fenol oxidasa. Tres de ellas también mostraron actividad proteolítica. Esta especie ha sido recientemente descrita por su capacidad para degradar PAHs y antraceno (Godoy *et al.*, 2016; Mao y Guan, 2016). Las 5 cepas de *S. brevicaulis* correspondieron a las muestras del estructurante y a los tiempos 30 y 70. En el caso de la cepa *S. brevicaulis* HT17 (aislada a 55 °C) demostró la termotolerancia de esta especie. Esta especie ha sido aislada en procesos de compostaje con material lignocelulósico, tanto en el material de partida como en etapas mesófilas y termófilas (Jurado *et al.*, 2014).

Tabla 4.14. Producción de actividades enzimáticas extracelulares, identificación filogenética, porcentaje de identidad y número de acceso en el GenBank de los hongos aislados en la Pila II. (Positivo ■ Negativo □).

Muestra/tiempo de muestreo	Cepa	Hidrolíticas					Lignocelulosa					Identificación filogenética	% de indentidad	N° de acceso GenBank	
		Proteasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa				Peroxidasa
Estructurante	HM01	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100%	HM64
	HM02	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Byssosclamyces spectabilis</i>	100%	KP725000.1
	HM03	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	100%	LN850790.1
	HM08	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>	100%	KP131654.1
	HM09	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i>	100%	KC442276.1
0	HM10	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	94%	LC125991.1
	HM11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Eurotium chevalieri</i>	99%	HQ728257.1
	HM12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	100%	JQ690909.1
	HM17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Aspergillus tubingensis</i>	100%	HM64
	HM18	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	<i>Hormographiella aspergillata</i>	100%	KP132299.1

Muestra/tiempo de muestreo	Cepa	Hidrolíticas						Lignocelulosa					Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso GenBank
		Proteasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa	Peroxidasa			
1	HM19												<i>Byssochlamys spectabilis</i>	87%	HM02
	HM22												<i>Aspergillus idulans</i>	100%	KC806056.1
	HM23												<i>Tritiratum oryzae</i>	90%	GQ329853.1
	HM28												<i>Talaromyces purpureogenus</i>	99%	KU981069.1
	HM29												<i>Aspergillus versicolor</i>	100%	JX043092.1
	HM30												<i>Aspergillus versicolor</i>	100%	GU797139.1
	HT04												<i>Lichtheimia ramosa</i>	98%	GQ342877.1
5	HM38												<i>Byssochlamys spectabilis</i>	87%	HM02
8	HM40												<i>Cladosporium sp.</i>	100%	HQ829120.1
14	HM41												<i>Cladosporium sp.</i>	100%	HQ829120.1
	HM42												<i>Cladosporium sp.</i>	100%	HQ829120.2
30	HM43												<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	100%	HM03
	HM48												<i>Hormographiella aspergillata</i>	100%	KP132299.1
	HM49												<i>Trichosporon faecale</i>	100%	EF153624.1
40	HM53												<i>Circinella sp.</i>	87%	KF805760.1
	HM54												<i>Circinella sp.</i>	87%	KF805760.1
70	HM56												<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	99%	LN850786.1
	HM57												<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	98%	KC311514.1
	HM59												<i>Dichotomomyces cejpii</i>	100%	KF706672.1
	HM60												<i>Purpureocillium lilacinum</i>	99%	KC311490.1
	HM64												<i>Aspergillus tubingensis</i>	99%	KP725001.1
	HT17												<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	98%	KC311514.1

Muestra/tiempo de muestreo	Cepa	Hidrolíticas					Lignocelulosa					Identificación filogenética	% de indentidad	Nº de acceso GenBank	
		Proteasas	Amilolítica	Fosfato soluble	Lipasa	Amonificante	Tirosinasa	Pectinasa	Hemicelulasa	Celulasa	Lacasa				Peroxidasa
120	HM65												<i>Aspergillus versicolor</i>	100%	FJ878627.1
	HM69												<i>Acremonium flavum</i>	99%	HQ232037.1
	HM70												<i>Thielavia</i> sp.	99%	GU055519.1
	HM71												<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100%	KC157756.1
	HM74												<i>Bjerkandera</i> sp.	98%	KT305937.1
	HM78												<i>Dichotomomyces cejpii</i>	97%	KF706672.1
	HM81												<i>Aspergillus niger</i>	99%	KU323591.1
	HM82												<i>Acremonium chrysogenum</i>	98%	U57672.1

En el lodo no se consiguió aislar ningún hongo, a diferencia de los resultados observados mediante técnicas independientes de cultivo. Una de las especies más frecuentes fue *Byssochlamys spectabilys*, aislada del estructurante vegetal y al inicio del proceso. Las especies anamorfias de *Byssochlamys* son comunes en el compost (Samson *et al.*, 2009). *Scedosporium aurantiacum* fue igualmente detectada al inicio del proceso y ha sido descrita como especie patógena oportunista aislada en procesos de compostaje (De Gannes *et al.*, 2013). *Cladosporium cladosporioides* fue el único aislado en las muestras correspondientes a los tiempos 8 y 14, coincidiendo con el periodo de mayor temperatura alcanzada durante el proceso bajo cubierta.

Las cepas HM18 y HM48 fueron identificadas como *Hormographiella aspergillata* y mostraron un alto número de actividades enzimáticas. Entre ellas destacaron las proteasas, amilasas, actividad amonificante, lacasas, peroxidadas y fenol oxidadas y tirosinasa, pectinasa, hemicelulasa y celulasas. Esta especie ha sido descrita previamente en su forma teleomorfa (*Coprinus* sp) durante procesos de compostaje en fases de altas temperaturas (Wright *et al.*, 2016). Sin embargo, este hongo es un patógeno oportunista que se ha relacionado con complicaciones en pacientes con tratamientos frente a infecciones pulmonares (Godet *et al.*, 2017).

Las especies de *Aspergillus* mostraron una alta tasa de producción enzimática con resultados positivos en las actividades amilolítica, amonificante, tirosinasa, pectinasa, celulasa, lacasa y peroxidasa, además de proteasa, fosfato soluble, amonificante, en función de la cepa (Tabla 4.14). Algunas de estas enzimas ya han sido previamente identificadas en el género *Aspergillus* como es el caso de las celulasas producidas por *A. niger*, el cual ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria y es considerado un microorganismo seguro (Gené *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 2002). La producción enzimática de este hongo ha sido ampliamente estudiada por su alta degradación en compuestos farmacéuticos (Olicón-Hernández *et al.*, 2017; Touahar *et al.*, 2014).

Thielavia sp. HM70 fue otra cepa identificada durante el proceso de compostaje, y destacó por producir todas las actividades ligninolíticas determinadas. *Thielavia* es un hongo ascomiceto que incluye especies mesófilas y termotolerantes capaces de secretar hasta cinco tipos de lacasas, tal y como se ha descrito previamente (Ammann *et al.*, 2014; Berka *et al.*, 2011).

En la fase de maduración también fue identificado *Purpureocillium lilacinum* HM60 y HM71 (aislados a los 70 y a los 120 días) y en ambas cepas se detectó actividad hemicelulasa y celulasa. Estudios previos han evidenciado la presencia de genes implicados en la degradación de la celulosa y hemicelulosa en cepas de este género empleadas para el biocontrol de nematodos en plantas (Xie *et al.*, 2016).

Otra de las cepas a destacar por el número de enzimas producidas fue *Bjerkandera* HM70, con resultados positivos para 6 actividades, entre ellas, mayoritariamente oxidoreductasas como lacasa, peroxidasa y polifenol oxidasa. Además, mostró actividades hidrolíticas como celulasa, proteasa y amilolítica. *Bjerkandera* es un hongo muy conocido de la podredumbre blanca y cuyo genoma está completamente anotado. Se caracteriza por presentar una amplia batería enzimática, principalmente peroxidasas, como la peroxidasa versátil, manganeso peroxidasas y lacasas, inducibles en presencia de material lignocelulósico (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2013).

5. Discusión General

El compostaje de lodos es una tecnología frecuentemente utilizada para la gestión y revalorización de este residuo. A pesar de ser un proceso genérico y ampliamente conocido, la variabilidad de tecnologías disponibles hace que, en cada caso, las condiciones operacionales cambien en función de la tecnología empleada.

El estudio de las condiciones operacionales mediante la evolución de los principales parámetros, se convierte entonces en una herramienta útil para la optimización del proceso. Generalmente, los parámetros más estudiados son los parámetros físico-químicos, aunque estos están interconectados con los parámetros microbianos, al ser los microorganismos los principales responsables de llevar a cabo el proceso. La relación C/N, la humedad, los sólidos volátiles, así como los parámetros relativos a la carga de patógenos recogidos en la normativa, representan los factores más importantes que deben tenerse en cuenta para la optimización del compostaje.

Los resultados que se muestran en este trabajo analizaron aspectos físico-químicos, parámetros bioquímicos y la estructura de las comunidades microbianas implicadas en dos pilas de compostaje construidas a escala real.

El estudio se realizó en dos fases, una primera fase de estudio sobre una pila que se denominó Pila I y una segunda fase optimizada sobre una pila denominada Pila II. Los resultados obtenidos en la Pila I permitieron reducir la etapa de compostaje bajo cubierta de la Pila II (60 días) y en consecuencia, optimizar el proceso, lo que implica un abaratamiento de los costes.

Uno de los factores determinantes en los procesos de compostaje es la temperatura máxima alcanzada y en especial, la duración. En este estudio, el perfil de temperaturas fue muy similar en ambos ensayos, tanto en el tiempo en alcanzar los valores máximos, como en los valores máximos alcanzados (10 días, 78.5 °C en la Pila I y 11 días, 79 °C en la Pila II). Esta temperatura máxima coincide con la temperatura observada en otras pilas con cubierta y aireación forzada, donde la aireación es más eficaz. Además, se reducen las pérdidas de nitrógeno por volatilización y los problemas de olores, aunque por otro lado, la cubierta impide la homogenización de la pila generando una estratificación por temperaturas (Ma *et al.*, 2018; Rasapoor *et al.*, 2016).

La retirada de la cubierta dio paso a la fase de maduración, donde ambas pilas tuvieron el descenso más notable de la temperatura. En la Pila I, este descenso se produjo a los 60 días, mientras que en la Pila II, las temperaturas más bajas se alcanzaron a los 40 días. En esta fase, ambas pilas experimentaron subidas de temperatura a pesar de que se encontraba al aire libre, probablemente por las chimeneas originadas de la actividad microbiana.

El incremento de temperaturas fue más notable en la Pila I, en la que se llegaron a alcanzar temperaturas cercanas a los 80 °C (alrededor de los 100 días), estabilizándose a continuación a temperaturas que oscilaron entre 55-70 °C. Resultados similares se observaron en la Pila II, en este caso, la temperatura se estabilizó entre los 45-75 °C. La monitorización de la temperatura en distintas profundidades de la pila, permitió comprobar la estratificación de la misma en función de la profundidad, debido a la retirada de la cubierta y a la exposición a la temperatura ambiente. Los valores registrados en este estudio no siguen la tendencia de otros procesos de compostaje de lodos descritos por otros autores y en los que, durante la fase de maduración, la temperatura decrece hasta rangos de 20-30 °C (Villar *et al.*, 2016).

De acuerdo con las temperaturas obtenidas, este proceso cumpliría uno de los requerimientos recogidos en la regulación de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 2003), en la que se requiere que el compost haya estado expuesto a temperaturas de 55 °C durante al menos 3 días consecutivos. Las pilas estudiadas en este trabajo mantuvieron temperaturas por encima de los 65 °C, incluso en la fase de maduración. Además, este requisito permite asegurar una correcta higienización del producto, ya que la presencia de microorganismos patógenos, generalmente entéricos, en el compostaje de lodos es un hecho a considerar debido a la composición del lodo (Sidhu y Toze, 2009). Algunos autores proponen temperaturas superiores a 60 °C durante al menos 3 días, aunque esto no garantiza la higienización homogénea de patógenos (Scaglia *et al.*, 2014). Otros autores, afirman que la higienización completa del compost se produce a temperaturas termófilas (55-60 °C) durante 2-3 semanas (Kiely, 1999). En este estudio, en los lodos de partida usados en ambas pilas, se detectaron valores de patógenos por encima de los permitidos, lo que

indicaría que la digestión parcial anaerobia mesófila no sería suficiente para inactivarlos. Sin embargo, en el compost final, no se detectaron ni *E. coli* ni *Salmonella*, confirmando la capacidad de higienizar de este proceso. Los actuales parámetros recogidos en el Anexo V de RD 824/2005 incluyen únicamente *Salmonella* y *E. coli*. Sin embargo, habría que establecer unos indicadores más reales que los actuales y en los cuales se incluyeran otros microorganismos, como los virus, debido a su potencial como fuente de enfermedades emergentes y a su mayor resistencia a los tratamientos tanto físico-químicos como biológicos.

Como resultado del compostaje, se obtuvieron valores de conductividad más bajos en el compost de la Pila II que en el de la Pila I, debido posiblemente a que se partieron de valores de conductividad más bajos en el material de partida en la Pila I que en la Pila II. En ambos casos, el valor obtenido estuvo por debajo del cual se ha constatado como apropiado para su uso como fertilizante (Chen *et al.*, 2014).

En ambas pilas se observó una tendencia similar en los valores de pH, con una disminución en la fase bajo cubierta y un incremento en la fase de maduración hacia valores de pH en torno a la neutralidad. La tendencia a incrementar el pH durante el compostaje se ha visto en otros procesos como el descrito por Echeverría y colaboradores (2012), que sugirieron que el aumento del pH podía estar asociado a la liberación de amoníaco como resultado de la mineralización de proteínas. En ambos casos se obtuvieron valores de pH entre 7 y 8, considerados como aptos para aplicaciones agrícolas, ya que valores de pH muy alcalinos, podrían limitar el desarrollo de plantas y cultivos (Oviedo-Ocaña *et al.*, 2015).

El contenido de humedad resulta fundamental para el transporte de nutrientes disueltos, requeridos para las actividades fisiológicas y metabólicas de los microorganismos. Dicho contenido dependerá de las propiedades físico-químicas y de las características biológicas del material a compostar, además de las condiciones operacionales, como puede ser el volteo, riego de la pila o la incorporación de un sistema de aireación (Guo *et al.*, 2012). Además, este parámetro está recogido por la legislación a la hora de clasificar el compost para su aplicación. Los valores de

humedad del material a compostar variaron entre la Pila I y II. A pesar de partir de valores de humedad más altos en la Pila I, en ambas pilas se alcanzaron porcentajes similares de humedad en el compost final, estando por debajo del límite marcado en el RD 506/2013.

Las fluctuaciones en la materia orgánica y el %NTK fueron similares en ambas pilas. En el caso del CO_x, se incrementó durante la etapa bajo cubierta y la tendencia fue a decrecer hacia el final del proceso. En el caso de la Pila I, se alcanzaron valores más bajos, ya que el tiempo de maduración de esta Pila fue también mayor. Los valores de %MO y %SV tuvieron una tendencia muy similar en ambas pilas alcanzando en ambos casos los valores exigidos por la legislación al final del proceso, según el RD 506/2013. En el caso del %NTK, fue ligeramente mayor en la Pila I con respecto a la Pila II, pero los valores finales en ambas pilas fueron muy similares.

El ratio C/N fue mayor en la Pila II aunque ambas pilas alcanzaron valores de 13 a los 120 días. En la Pila I, la duración mayor del compostaje hizo que este ratio alcanzara un valor de 4 a los 190 días. Existe cierta controversia con respecto a los valores para este parámetro relacionados con el estado de maduración del compost, siendo apropiado asociar una disminución del mismo como indicativo de la degradación de la materia orgánica. Algunos autores sugieren que valores en torno a 15 expresan la estabilización del compost y son adecuados, ya que no ocasionan una alteración de la actividad microbiana del suelo en el que son añadidos (Bernai *et al.*, 1998; Hortenstine y Rothwell, 1973). Por otro lado, Roca-Pérez y colaboradores (2009), relacionaron valores C/N próximos a 10 y pH cercanos a la neutralidad con un alto nivel de degradación y humificación de la materia orgánica. La normativa española vigente establece valores inferiores a 20, en lo que se refiere a enmiendas orgánicas de compost, por lo que en ambas pilas, los valores están en concordancia con estos autores y dentro la normativa (Real Decreto 506/2013, 2013).

La concentración de metales pesados es uno de los parámetros más restrictivos que se recoge en el RD 824/2005 a la hora de considerar un compost apto para su aplicación en suelos, debido a que los metales pueden ser absorbidos por las plantas y

entrar dentro de la cadena trófica. En ambas pilas, los valores finales obtenidos permitió su clasificación como compost Clase B, que restringe su aplicación a cultivos hortícolas comestibles, siendo el Zn y el Cd los metales más abundantes en el compost final. La evolución de la concentración de los metales pesados experimentó cambios más drásticos bajo la cubierta que en la fase de maduración. Se observó que alargar el tiempo de maduración de la Pila I no favoreció la reducción de su concentración, ya que su disponibilidad depende de muchos otros factores. Se sabe que los metales pesados son uno de los contaminantes más recalcitrantes que existen y su eliminación biológica se limita a procesos de bioadsorción o acumulación. Algunos hongos son capaces de modificar la valencia, modificando por tanto sus propiedades de adsorción y acumulación (Javanbakht *et al.*, 2014).

Las actividades enzimáticas determinadas en ambas pilas, mostraron valores promedios más altos para las actividades deshidrogenasa, proteasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en la Pila II que en la Pila I, mientras que los valores de β -glucosidasa y arilsulfatasa fueron mayores en la Pila I. Todas las actividades enzimáticas mostraron una tendencia a estabilizar sus valores hacia el final de la fase de maduración. Cabe destacar que, en el caso de la Pila II, se determinaron valores promedios mayores en la fase maduración con respecto a la Pila I, aunque más estables. La tendencia general, para la mayoría de las actividades enzimáticas, fue una estabilización durante la fase de compostaje o un decrecimiento de la actividad hacia el final del proceso. En la Pila II, la estabilización de los valores de las actividades enzimáticas como proteasa, fosfatasa, glucosidasa y arilsulfatasa, fue más evidente durante la fase de maduración, por lo que acortar el tiempo bajo cubierta podría acelerar la estabilización de la actividad microbiana en esta fase de maduración

De acuerdo con Mondini y colaboradores (2004), la relación entre las actividades enzimáticas y la cantidad y calidad de materia orgánica podría proporcionar información sobre la estabilidad del compost, definida como el grado de descomposición de la materia orgánica fácilmente biodegradable. En la Pila I, la evolución de la actividad deshidrogenasa tuvo una tendencia similar a la del CO_x y a la de la materia orgánica, coincidiendo el punto máximo al principio del proceso. Además

en el estudio de las variables, se observó que esta enzima estuvo correlacionada con la materia orgánica. De acuerdo con Benito y colaboradores (2005), los valores de deshidrogenasa por debajo de $0.6 \text{ mg TFF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se consideran un factor de estabilización del compost, valores que se obtuvieron en ambas pilas. Además, los valores finales de deshidrogenasa, también coincidieron con los valores propuestos por Tiquia y colaboradores (2005), como predictivos de la madurez del compost. Nikaeen y colaboradores (2015) determinaron un rango de valores acorde con los determinados en este estudio en la etapa de maduración, en el que se determinó que, la ausencia de cambios significativos en los valores de la deshidrogenasa en la etapa de maduración, podría ser considerado como indicio del estado de madurez del compost. En la relación fosfatasas/ P_5O_2 y proteasa/NTK, no se vio una tendencia similar y no se detectó correlación alguna. Tampoco se observó una tendencia clara entre ningún parámetro con las actividades β -glucosidasa y arilsulfatasa.

Los resultados obtenidos, en cuanto a diversidad bacteriana, demostraron la gran diversidad y cambios graduales en las comunidades durante en el compostaje, siendo la fase bajo cubierta una etapa crucial como fase bio-oxidativa del proceso (Agnolucci *et al.*, 2013; Storey *et al.*, 2015). En la evolución de la diversidad bacteriana en las dos pilas de compostaje, los principales filos representados fueron el filo Proteobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Bacteroidetes, Planctomycetes, y Actinobacteria siendo los únicos filos determinados en la Pila I y los mayoritarios en la Pila II. Esta tendencia ha sido previamente descrita en otros procesos de compostajes por varios autores (Awasthi *et al.*, 2017; Tortosa *et al.*, 2017).

La composición del lodo de partida fue similar en ambas pilas, dominada por los órdenes *Clostridiales*, *Rizhobiales* y *Actinomycetales* con un 60% de abundancia relativa en el caso de la Pila I y algo superior al 40% en la Pila II. El estructurante vegetal tuvo un mayor porcentaje de representantes del orden *Pseudomonadales* en la Pila I que en la II y también destacaron los órdenes *Bacillales* y *Actinomycetales* en estas muestras. Los órdenes *Clostridiales* y *Bacillales* también poseen especies conocidas como productores de enzimas involucradas en la degradación de compuestos lignocelulósicos como la celulosa y la hemicelulosa (Antunes *et al.*, 2016). Mediante

Source tracker se demostró que gran parte de las comunidades bacterianas provenían del estruante vegetal y el proceso favoreció la presencia de estas comunidades. En nuestro estudio se observaron dos cambios principales en el perfil de diversidad de bacterias en la Pila I. Primero, entre 15 y 30 días, correspondientes a una mayor diversidad. Otro cambio importante ocurrió entre los días 120 y 190, donde 4 órdenes minoritarias aumentaron su abundancia relativa, como *Rhizobiales* y *Rhodobacterales*, así como *Sphaerobacterales* y *Clostridiales* a los 190 días.

En la Pila II, la evolución de la diversidad bacteriana cambió drásticamente a los 8 días, coincidiendo con las temperaturas más altas. Este hecho hizo que en las muestras de los días 14 y 30 aparecieran otras comunidades bacterianas como los órdenes *Thermales* y *Sphaerobacterales*. La eliminación de la cubierta permitió la recolonización de las poblaciones iniciales, obteniendo finalmente un perfil más diverso al final del proceso. Por tanto, los cambios poblacionales descritos en la Pila I también se observaron en la Pila II. Los perfiles poblacionales de las muestras 60, 120 y 190 de la Pila I guardan similitud con los días 40, 70 y 120 de la Pila II, sugiriendo que el acortamiento de la etapa bajo cubierta no afectó a la sucesión de las comunidades bacterianas, sin embargo, permitió acortar la duración total del proceso.

En los procesos de compostaje, los sustratos fácilmente metabolizables se degradan en las primeras etapas, mientras que los microorganismos con capacidad para degradar los compuestos recalcitrantes aparecen durante la fase de maduración. En esta línea, muchos de los órdenes identificados mediante secuenciación masiva están relacionados con procesos de degradación. Este es el caso del orden *Rhizobiales*, bacterias aeróbicas capaces de crecer en un rango entre los 45-50 °C; además son capaces de degradar compuestos aromáticos (Taylor *et al.*, 2012), como las especies del género *Pseudomonas* (Lalucat *et al.*, 2006). Algunos autores han evidenciado la presencia de *Rhizobiales* y *Sphingomonadales* asociados a la degradación de compuestos recalcitrantes como los compuestos policíclicos aromáticos (PAHs) (Bastida *et al.*, 2016). La degradación de polímeros complejos en compostaje está usualmente asociada a las comunidades fúngicas y sus enzimas inespecíficas extracelulares. Sin embargo, los órdenes *Actinomycetales* y *Bacillales* también poseen capacidad para

degradar celulosa, solubilizar lignina y tolerar altas temperaturas y pH (Martins *et al.*, 2013).

Las técnicas dependientes de cultivo también confirmaron este hecho en ambas pilas, poniendo de manifiesto la presencia de los órdenes *Bacillales*, *Actinomycetales* y *Pseudomonadales* en ambas pilas, aunque en la Pila II, también se aislaron especies pertenecientes a *Lactobacillales*. En el orden *Bacillales* destacó el género *Bacillus*, como se ha determinado en otros estudios de compostaje (Bhatia *et al.*, 2013; de Gannes *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2009). destacando especies como *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. stratosphericus*, *B. pumilus* . También predominó la especie *Geobacillus thermodesnitrificans* en la Pila I, la cual ha sido detectada frecuentemente en procesos de compostaje y son consideradas bacterias autóctonas de este proceso debido a sus características termófilas. Por ello, habitualmente son inoculadas en algunos procesos de compostaje, para acelerar la descomposición del material lignocelulósico (Sarkar *et al.*, 2010). *Geobacillus* sp, al igual que *B. subtilis*, también presente en este estudio, son conocidas por su capacidad para degradar compuestos lignocelulósicos (Zainudin *et al.*, 2013). En la Pila II destacaron *B. pumilus*, *B. Stratosphericus* y *B. safensis* pero también *Pseudomonas formosensis* como productoras de enzimas proteasas, aunque no se detectaron diferencias significativas en la secreción función de la temperatura. *B.stratosphericus* BM20, BT02 BM43, junto con *B. safensis* BM34 tuvieron una mayor producción. Entre las enzimas extracelulares determinadas destacó la producción de peroxidasas y fenol oxidasas, la actividad amonificante y las amilasas. La actividad amonificante fue una actividad muy frecuente, demostrando la capacidad de los aislados de transformar el nitrógeno orgánico en amonio (Geisseler *et al.*, 2010).

El análisis de secuenciación de la comunidad fúngica (determinados en la Pila II) mostró una gran diversidad, incluso en las etapas de mayor temperatura, indicando su implicación en la degradación y no sólo en fases de humificación como se ha descrito por numerosos autores. Los órdenes mayoritarios al inicio del proceso fueron *Eurotiales*, *Saccharomycetales* y *Agaricales*. Dentro del orden *Sachcharomycetales*, se incluyen a numerosas especies de levaduras, probablemente por la acidez del medio originada por la producción de los ácidos, como consecuencia de la degradación del

material fácilmente asimilable. Los estudios llevados a cabo por Langarica-Fuentes y colaboradores (2014b), asociaron la presencia de algunas levaduras del orden *Saccharomycetales* con el contenido de agua, de manera que al igual que el pH, éste podría ser un factor a considerar en la proliferación de estos microorganismos. En nuestro estudio se observó que la mayor abundancia de *Saccharomycetales* se obtuvo a los 2 días del proceso, coincidiendo con el valor más alto de humedad (46%). Al final de la etapa bajo cubierta, se mantuvieron en porcentajes de abundancia relativa más bajos para este orden, ya que *Saccharomycetales* son capaces de formar esporas tolerando a altas temperaturas. Una vez alcanzada la máxima temperatura bajo cubierta semipermeable, el orden *Sordariales* incrementó su abundancia. Especies pertenecientes a *Sordariales* han sido caracterizadas como termófilas y detectadas en otros procesos de compostaje (Gu *et al.*, 2017).

En la etapa de mayor temperatura hubo un predominio de los órdenes *Sordariales*, *Eurotiales*, *Agaricales* e *Hypocreales* siendo *Sordariales* y *Eurotiales* los órdenes con mayores representantes de especies termófilas y termotolerantes caracterizadas en otros procesos de compostaje (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014b). Muchos de los órdenes indentificados han sido recientemente descritos como microbiota típicamente característica del proceso de compostaje. Esto ocurre con órdenes incluidos en la clase *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Sordariomycetes*, y *Agaricomycetes*, de acuerdo con Galitskaya y colaboradores (2017). En el análisis de la comunidad fúngica en compostaje de material lignocelulósico, llevado a cabo por López-González y colaboradores (2015), se caracterizaron dos tipos de comunidades: la comunidad residente y la comunidad transeúnte, mediante técnicas cultivables. En este estudio, mediante los datos de secuenciación, no se distinguió la comunidad residente, sino que al ser un proceso predominantemente termófilo, es destacable la amplia diversidad de las comunidades fúngicas, a pesar de las temperaturas predominantemente termófilas. A partir de este tiempo, se incrementó drásticamente la población de *Mortierellales* y su abundancia relativa se mantuvo superior al 20% hasta el final del proceso. En la fase de maduración, *Mortierellales*, *Dothideomycetes* (clase), *Eurotiales* y *Sordariomycetes* (clase) fueron los mayores representantes alcanzando la mayor diversidad con un perfil más equitativo siendo esta tendencia similar a la descrita por (Bonito *et al.*, 2010).

Generalmente, las poblaciones fúngicas se asocian a las fases mesófilas y de maduración, debido a la capacidad de las bacterias a tolerar altas temperaturas. Sin embargo, los hongos termófilos son capaces de degradar compuestos a temperaturas entre 40-50 °C. Muy pocas especies de hongos se han recuperado en etapas termófilas, aunque los hongos termófilos descritos están bien adaptados a la condiciones y son los principales responsables de la degradación de compuestos lignocelulósicos, como es el caso de *Sordariales* y *Eurotiales* (Langarica-Fuentes *et al.*, 2015, Morgenstern *et al.*, 2012). En este sentido, la disponibilidad de nutrientes y fuentes de carbono determinará la rotación de comunidades, que aumentará su diversidad después de la fase de mayor temperatura, permitiendo el desarrollo de distintas redes de alimentación más complejas entre microorganismos (Bonito *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2016).

La comunidad fúngica cultivable mostró una predominancia de representantes de la división *Ascomycota* seguidos por los hongos de la división *Basidiomycota* y la subdivisión *Mucoromycotina*, coincidiendo con nuestros datos de secuenciación y como se ha evidenciado también en otros procesos con técnicas independientes de cultivo (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014b). En el lodo no se obtuvo ningún hongo cultivable, indicando la importancia de emplear técnicas independientes de cultivo en los estudios de diversidad. Algunos de los hongos aislados en la fase bajo cubierta fueron *Aspergillus*, *Circinella* (hongos saprófitos y nematófagos) y *Talaromyces*, descritos como hongos encargados de la degradación en etapas termófilas, debido a su resistencia a altas temperaturas (50-65 °C). Estos hongos filamentosos pertenecen a los órdenes *Hypocreales*, *Sordariales* y *Microascales* con representantes mesófilos y termófilos, coincidiendo con los órdenes previamente descritos mediante técnicas independientes de cultivo. Una dinámica similar en la sucesión de comunidades fúngicas con estas técnicas ha sido descrita por varios autores, como es el caso del estudio llevado a cabo por Ryckeboer *et al.*, (2003) donde se identificaron representantes *Aspergillus*, *Scopulariopsis* y *Acremonium* entre otras, como géneros característicos de este proceso. Todos estos géneros (excepto *Scopulariopsis*) junto con *Coprinopsis* (*Hormographiella*) y *Trichosporon*, han sido determinados en muestras de

compost, dentro de los 20 géneros más abundantes mediante técnicas de pyrosecuenciación (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014b).

En el estudio de la microbiota fúngica cultivable del compostaje de material lignocelulósico llevado a cabo por Jurado y colaboradores (2014) y López-González y colaboradores (2015) se puso de manifiesto la idoneidad de este proceso para la búsqueda de hongos con actividad enzimática extracelular. Muchas de estas especies se caracterizan por su capacidad para producir enzimas modificadoras de lignina, principalmente peroxidasas, participando en procesos de humificación. Las enzimas más frecuentes entre los aislados fúngicos fueron las enzimas hidrolíticas amilasas y proteasas; y las enzimas ligninolíticas, especialmente las peroxidasas, fenol oxidasa, pectinasas y celulasas. Algunos de los representantes más frecuentes en la fase bajo cubierta, y por tanto con capacidad para tolerar altas temperaturas, fueron *Aspergillus tubingensis*, *Byssochlamis spectabilis*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium* sp. En la fase de maduración, destacaron especies como *Purpureocillium lilacinum*, *Thielavia*, *Bjerkandera*, *Dichotomyces cejpai*, *Acremonium flavum* y *Acremonium chrysogenum*, exclusivos de esta fase, y por tanto pudiéndolos relacionar con procesos de humificación del material, ya que constituyen los únicos sustratos disponibles. Dentro de este grupo destacaron *Thielavia*, *Bjerkandera* caracterizados por su capacidad de producción de lacasas y peroxidasas (Daâssi *et al.*, 2016, Reina *et al.*, 2014).

Los análisis de la comunidad vírica evidenciaron una amplia diversidad de morfologías mediante microscopía, tanto en el lodo como en distintas etapas del proceso. Muchas de estas morfologías coinciden con estudios similares en biosólidos o aguas residuales no tratadas. Los cambios evidenciaron una mayor diversidad a los 14 días y una disminución a los 70 siendo los virus principales bacteriófagos y virus de plantas. La diversidad de virus bacterianos y su especificidad con los taxones más abundantes durante el proceso de compostaje, muestra la importancia de esta comunidad en el control de la comunidad bacteriana. Por otro lado destacó que las mayores abundancias relativas correspondieran con virus de plantas procedentes tanto de las muestras de lodo como probablemente de las muestras de estructurante no

analizadas en este estudio. Este hecho sugiere la necesidad del análisis específico de estos virus en los materiales de partida así como su monitoreo durante el proceso de compostaje, a fin de evitar efectos negativos en el uso final del compost como enmienda orgánica.

6. Conclusiones- Conclusions

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral permitieron poner de manifiesto las siguientes conclusiones:

1. La cubierta semipermeable representa una tecnología apropiada para el proceso de compostaje de lodos de depuradora, permitiendo que la temperatura de las pilas alcance valores superiores a 70 °C en los primeros 10 días, se evite la salida de olores y mantenga las condiciones termófilas, incluso en la etapa de maduración.
2. El mantenimiento de las altas temperaturas durante la mayor parte del proceso de compostaje con este sistema, permite obtener un producto higienizado libre de patógenos y que cumple con los parámetros exigidos por la normativa vigente.
3. La estabilización de los parámetros físico-químicos relativos a la materia orgánica son parámetros que pueden usarse para acortar el tiempo de compostaje bajo la cubierta.
4. La reducción del tiempo de compostaje bajo la cubierta de 60 a 30 días no altera los valores físico-químicos ni microbiológicos del compost final.
5. La actividad enzimática y la evolución de la microbiota son parámetros apropiados indicativos de la estabilización de una pila de compostaje, consiguiendo una estabilización de los mismos en la fase de maduración.
6. En ambos sistemas, el mayor incremento de la temperatura durante la fase bajo cubierta propició el incremento de la diversidad de la comunidad bacteriana y fúngica.
7. La microbiota bacteriana predominante durante el proceso bajo cubierta fueron los órdenes *Bacillales* y *Actinomycetales*. El género bacteriano predominante durante todo el proceso y que demostró tener un amplio abanico de

actividades enzimáticas extracelulares fue *Bacillus*. La diversidad bacteriana al final del proceso de ambas pilas mostró perfiles similares, a pesar de que el tiempo de la Pila II fue menor, evidenciando la posibilidad de acortar la fase bajo cubierta sin que afecte a las comunidades bacterianas.

8. Las comunidades fúngicas se sucedieron con el predominio de *Saccharomycetales* y *Agaricales* al inicio del proceso, la aparición de especies termotolerantes como *Thermales* en la etapa de mayor temperatura y el predominio de *Eurotiales* y *Mortierellales* en la etapa de maduración, coincidiendo con las especies cultivables obtenidas.
9. La comunidad vírica en las muestras analizadas fue muy diversa, siendo predominantes los virus de plantas y los bacteriófagos, pudiendo tener estos últimos un efecto importante en el control de poblaciones bacterianas. La comunidad vírica causante de enfermedades en humanos tuvo una baja representación en el compost final, estando representada por virus gastrointestinales.
10. Las pilas de compostaje representan un lugar óptimo para la obtención de microorganismos productores de enzimas extracelulares. Así, los microorganismos cultivables aislados durante el proceso presentaron una amplia diversidad metabólica, con presencia de enzimas responsables de la degradación, tanto de compuestos fácilmente degradables como de compuestos recalcitrantes.

The results obtained during this Doctoral Thesis prove the following conclusions:

1. The semipermeable cover is an appropriate tool for sewage sludge composting, allowing temperatures in the piles to reach values above of 70 °C in the first 10 days. Semipermeable covers deter bad odors and maintain thermophilic conditions, even in the maturation stage.
2. The maintenance of high temperatures during the majority of the process in this system yields a sanitized product, pathogen-free and in compliance with the normative standards.
3. The stabilization of physico-chemical parameters relative to organic matter could be used to shorten the time of composting under semipermeable cover.
4. The reduction of composting time under semipermeable cover from 60 to 30 days does not affect the physico-chemicals and microbiological parameters of the final compost.
5. The enzyme activity and the evolution of microbial parameters are appropriate as indicators of this composting pile, as they stabilize during the maturation phase.
6. In both systems, the augmentation of temperature during under cover phase promotes the increase of bacterial, fungal and viral community.
7. The predominant bacteria population consists of the orders *Bacillales* and *Actinomycetales* during the process of composting. The predominant bacteria genus, *Bacillus*, demonstrated broad extracellular enzymatic activity. The bacterial diversity at the end of the composting process in both piles showed similar diversity profiles despite the difference in total time. This fact, shows that the possibility to shorten the under cover phase with no changes in the bacteria communities.

8. Fungal communities demonstrate a succession of population changes beginning with a predominance of *Saccharomycetales* and *Agaricales* early in the process. Thermotolerant species like *Thermales* spp. appear with higher temperatures and in the maturation stages are dominated by *Eurotiales* and *Mortierellales*, according to culture and uncultured techniques.
9. Viral community analysis shows a broad diversity with phytopathogen virus and bacteriophages dominating. The latter group could have an important effect in the control of bacteria population. Viral community involved in human diseases had a low representation in final compost, which consisted mainly of gut viruses.
10. The composting piles represent an adequate source of microorganisms for production of extracellular enzymes. As such, cultured microorganisms isolated during the process may present a range of metabolic diversity. The production of enzymes responsible for the degradation metabolic and recalcitrant compounds can be further isolated and applied.

7. Bibliografía

- Ackermann, H.-W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* *146*, 843–857.
- Agnew, J.M., and Leonard, J.J. (2003). The physical properties of compost. *Compost Sci. Util.* *11*, 238–264.
- Agnolucci, M., Cristani, C., Battini, F., Palla, M., Cardelli, R., Saviozzi, A., and Nuti, M. (2013). Microbially-enhanced composting of olive mill solid waste (wet husk): Bacterial and fungal community dynamics at industrial pilot and farm level. *Bioresour. Technol.* *134*, 10–16.
- Akhavan Sepahy, A., Ghazi, S., and Akhavan Sepahy, M. (2011). Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by *Indigenous Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. *Enzyme Res.* *2011*.
- Albrecht, R., Petit, J.L., Calvert, V., Terrom, G., and Périssol, C. (2010). Changes in the level of alkaline and acid phosphatase activities during green wastes and sewage sludge co-composting. *Bioresour. Technol.* *101*, 228–233.
- Ammann, E.M., Gasser, C.A., Hommes, G., and Corvini, P.F.-X. (2014). Immobilization of defined laccase combinations for enhanced oxidation of phenolic contaminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 1397–1406.
- Antunes, L.P., Martins, L.F., Pereira, R.V., Thomas, A.M., Barbosa, D., Lemos, L.N., Silva, G.M.M., Moura, L.M.S., Epamino, G.W.C., Digiampietri, L.A., *et al.* (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. *Sci. Rep.* *6*.
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M., and Kalaichelvan, P.T. (2007). Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *23*, 475–481.
- Avgelis, A.D., and Manios, V.I. (1989). Elimination of tomato mosaic virus by composting tomato residues. *Neth. J. Plant Pathol.* *95*, 167–170.
- Awasthi, M.K., Li, J., Kumar, S., Awasthi, S.K., Wang, Q., Chen, H., Wang, M., Ren, X., and Zhang, Z. (2017). Effects of biochar amendment on bacterial and fungal diversity for co-composting of gelatin industry sludge mixed with organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.*
- Awasthi, M.K., Pandey, A.K., Bundela, P.S., and Khan, J. (2015). Co-composting of organic fraction of municipal solid waste mixed with different bulking waste: Characterization of physicochemical parameters and microbial enzymatic dynamic. *Bioresour. Technol.* *182*, 200–207.
- Bandick, A.K., and Dick, R.P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* *31*, 1471–1479.

- Barceló, D., and López, M.J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Téc. Seguim. Política Aguas *1*, 24.
- Barrena, R., Vázquez, F., and Sánchez, A. (2008). Dehydrogenase activity as a method for monitoring the composting process. *Bioresour. Technol.* *99*, 905–908.
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, B.E.L., Richnow, H.H., Hernández, T., von Bergen, M., and García, C. (2016). The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *J. Proteomics* *135*, 162–169.
- Benito, M., Masaguer, A., Moliner, A., Arrigo, N., Palma, R.M., and Efron, D. (2005). Evaluation of maturity and stability of pruning waste compost and their effect on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil Sci.* *170*, 360.
- Berka, R.M., Grigoriev, I.V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C., Moisan, M.-C., *et al.* (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat. Biotechnol.* *29*, 922.
- Bernai, M.P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M.A., and Cegarra, J. (1998). Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresour. Technol.* *63*, 91–99.
- Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., and Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* *100*, 5444–5453.
- de Bertoldi, M., Vallini, G., and Pera, A. (1983). The biology of composting: A review. *Waste Manag. Res.* *1*, 157–176.
- Bhat, M.K., and Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* *15*, 583–620.
- Bhatia, A., Madan, S., Sahoo, J., Ali, M., Pathania, R., and Kazmi, A.A. (2013). Diversity of bacterial isolates during full scale rotary drum composting. *Waste Manag.* *33*, 1595–1601.
- Bibby, K., Viau, E., and Peccia, J. (2011). Viral metagenome analysis to guide human pathogen monitoring in environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* *52*, 386–392.
- Bonito, G., Isikhuemhen, O.S., and Vilgalys, R. (2010). Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. *Bioresour. Technol.* *101*, 1021–1027.

- Cantalupo, P.G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A.D., Katz, J.P., Grabe, M., Hendrix, R.W., Girones, R., Wang, D., *et al.* (2011). Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. *MBio* *2*, e00180-11.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* *7*, 335–336.
- Casida, L.E., Jr., Klein, D.A., and Santoro, T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* *98*, 371–376.
- Castaldi, P., Garau, G., and Melis, P. (2008). Maturity assessment of compost from municipal solid waste through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Manag.* *28*, 534–540.
- Cayuela, M.L., Mondini, C., Sánchez-Monedero, M.A., and Roig, A. (2008). Chemical properties and hydrolytic enzyme activities for the characterisation of two-phase olive mill wastes composting. *Bioresour. Technol.* *99*, 4255–4262.
- Celano, G., De Angelis, M., Minervini, F., and Gobbetti, M. (2016). Different Flour Microbial Communities Drive to Sourdoughs Characterized by Diverse Bacterial Strains and Free Amino Acid Profiles. *Front. Microbiol.* *7*.
- Chen, Y., Yu, F., Liang, S., Wang, Z., Liu, Z., and Xiong, Y. (2014). Utilization of solar energy in sewage sludge composting: Fertilizer effect and application. *Waste Manag.* *34*.
- Cieślak, B., and Konieczka, P. (2017). A review of phosphorus recovery methods at various steps of wastewater treatment and sewage sludge management. The concept of “no solid waste generation” and analytical methods. *J. Clean. Prod.* *142*, 1728–1740.
- Clarke, B.O., and Smith, S.R. (2011). Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* *37*, 226–247.
- Clarke, K.R., and Ainsworth, M. (1993). A method of linking multivariate community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *92*, 205–219.
- Clarke, K.R., and Warwick, R.M. (1994). An approach to statistical analysis and interpretation. *Change Mar. Communities* *2*.
- Colombet, J., Robin, A., Lavie, L., Bettarel, Y., Cauchie, H.M., and Sime-Ngando, T. (2007). Virioplankton ‘pegylation’: Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *J. Microbiol. Methods* *71*, 212–219.

- Cotty, P.J., Cleveland, T.E., Brown, R.L., and Mellon, J.E. (1990). Variation in polygalacturonase production among *Aspergillus flavus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 3885–3887.
- Criquet, S., Braud, A., and Nèble, S. (2007). Short-term effects of sewage sludge application on phosphatase activities and available P fractions in Mediterranean soils. *Soil Biol. Biochem.* *39*, 921–929.
- Cukjati, N., Zupančič, G.D., Roš, M., and Grilc, V. (2012). Composting of anaerobic sludge: An economically feasible element of a sustainable sewage sludge management. *J. Environ. Manage.* *106*, 48–55.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *JoVE J. Vis. Exp.* e899–e899.
- Daâssi, D., Zouari-Mechichi, H., Belbahri, L., Barriuso, J., Martínez, M.J., Nasri, M., and Mechichi, T. (2016). Phylogenetic and metabolic diversity of Tunisian forest wood-degrading fungi: a wealth of novelties and opportunities for biotechnology. *3 Biotech* *6*, 46.
- Darzi E., Smith E., Shargil D., Lachman O., Ganot L., and Dombrovsky A. (2017). The honeybee *Apis mellifera* contributes to Cucumber green mottle mosaic virus spread via pollination. *Plant Pathol.* *67*, 244–251.
- De Gannes, V., Eudoxie, G., and Hickey, W.J. (2013). Insights into fungal communities in composts revealed by 454-pyrosequencing: implications for human health and safety. *Front. Microbiol.* *4*.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., and Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *214*, 442–448.
- Déportes, I., Benoit-Guyod, J.-L., and Zmirou, D. (1995). Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *Sci. Total Environ.* *172*, 197–222.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., and Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 5069–5072.
- Díaz-Burgos, M.A., Ceccanti, B., and Polo, A. (1993). Monitoring biochemical activity during sewage sludge composting. *Biol. Fertil. Soils* *16*, 145–150.
- Directiva 2008/98
- Dumontet, S., Diné, H., and Baloda, S.B. (1999). Pathogen Reduction in Sewage Sludge by Composting and Other Biological Treatments: A Review. *Biol. Agric. Hortic.* *16*, 409–430.

- Dunlap, C.A., Kwon, S.-W., Rooney, A.P., and Kim, S.-J. (2015). *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *65*, 3487–3492.
- Dutta, S., William, P., Lokhande, S., Shinde, V.M., and Purohit, H.J. (2016). Response of anaerobic digester sludge for activator aided rapid composting and its effects on compost quality. *Int J Waste Resour* *6*, 2.
- Dyson, T. (1996). *Population and food: global trends and future prospects*. Routledge.
- Echeverria, M.C., Cardelli, R., Bedini, S., Colombini, A., Incrocci, L., Castagna, A., Agnolucci, M., Cristani, C., Ranieri, A., Saviozzi, A., *et al.* (2012). Microbially-enhanced composting of wet olive husks. *Bioresour. Technol.* *104*, 509–517.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* *26*, 2460–2461.
- Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* *10*, 996–998.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* *27*, 2194–2200.
- Eivazi, F., and Tabatabai, M.A. (1977). Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* *9*, 167–172.
- Eivazi, F., and Tabatabai, M.A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* *20*, 601–606.
- El Fels, L., Zamama, M., El Asli, A., and Hafidi, M. (2014). Assessment of biotransformation of organic matter during co-composting of sewage sludge-lignocelulosic waste by chemical, FTIR analyses, and phytotoxicity tests. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *87*, 128–137.
- Ellouze, M., and Sayadi, S. (2016). White-rot fungi and their enzymes as a biotechnological tool for xenobiotic bioremediation. pp 103-120. Intech
- Fan, L., McElroy, K., and Thomas, T. (2012). Reconstruction of ribosomal RNA genes from metagenomic data. *PLOS ONE* *7*, e39948.
- Fatokun, E.N., Nwodo, U.U., and Okoh, A.I. (2016). Classical optimization of cellulase and xylanase production by a marine *Streptomyces* species. *Appl. Sci.* *6*, 286.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.Á., and Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* *31*, 1808–1825.

- Franke-Whittle, I.H., Confalonieri, A., Insam, H., Schlegelmilch, M., and Körner, I. (2014). Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. *Waste Manag.* *34*, 632–641.
- Gajalakshmi, S., and Abbasi, S.A. (2008). Solid waste management by composting: state of the art. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* *38*, 311–400.
- Galitskaya, P., Biktasheva, L., Saveliev, A., Grigoryeva, T., Boulygina, E., and Selivanovskaya, S. (2017). Fungal and bacterial successions in the process of co-composting of organic wastes as revealed by 454 pyrosequencing. *PLOS ONE* *12*, e0186051.
- Gao, M., Li, B., Yu, A., Liang, F., Yang, L., and Sun, Y. (2010). The effect of aeration rate on forced-aeration composting of chicken manure and sawdust. *Bioresour. Technol.* *101*, 1899–1903.
- Gao, Y., Guan, X., Liu, Y., Li, X., Yun, B., Qi, X., Wang, Y., Gao, H., Cui, H., Liu, C., et al. (2015). An avian leukosis virus subgroup J isolate with a Rous sarcoma virus-like 5' -LTR shows enhanced replication capability. *J. Gen. Virol.* *96*, 150–158.
- Garcia, C., Hernandez, T., Costa, C., Ceccanti, B., Masciandaro, G., and Ciardi, C. (1993). A study of biochemical parameters of composted and fresh municipal wastes. *Bioresour. Technol.* *44*, 17–23.
- Garrido-Baserba, M., Molinos-Senante, M., Abelleira-Pereira, J.M., Fdez-Güelfo, L.A., Poch, M., and Hernández-Sancho, F. (2015). Selecting sewage sludge treatment alternatives in modern wastewater treatment plants using environmental decision support systems. *J. Clean. Prod.* *107*, 410–419.
- Gea, T., Barrena, R., Artola, A., and Sánchez, A. (2007). Optimal bulking agent particle size and usage for heat retention and disinfection in domestic wastewater sludge composting. *Waste Manag.* *27*, 1108–1116.
- Geisseler, D., Horwath, W.R., Joergensen, R.G., and Ludwig, B. (2010). Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review. *Soil Biol. Biochem.* *42*, 2058–2067.
- Gené, J., Guillamon, J.M., Guarro, J., Pujol, I., and Ulfig, K. (1996). Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. *Antonie Van Leeuwenhoek* *70*, 49–57.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., and Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 369–385.
- Gillis, A., and Mahillon, J. (2014). Phages Preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future. *Viruses* *6*, 2623–2672.

- Gleason, F.H., Kagami, M., Lefevre, E., and Sime-Ngando, T. (2008). The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biol. Rev.* *22*, 17–25.
- Glynn, J.A., Schaffel, S.D., McNicholas, J.M., and Hulett, F.M. (1977). Biochemical localization of the alkaline phosphatase of *Bacillus licheniformis* as a function of culture age. *J. Bacteriol.* *129*, 1010–1019.
- Godet, C., Cateau, E., Rammaert, B., Grosset, M., Moal, G.L., Béraud, G., Martellosio, J.P., Iriart, X., Cadranet, J., and Roblot, F. (2017). Nebulized liposomal amphotericin b for treatment of pulmonary infection caused by *Hormoglyphiella aspergillata*: case report and literature review. *Mycopathologia* *182*, 709–713.
- Godfree, A., and Farrell, J. (2005). Processes for managing pathogens. *J. Environ. Qual.* *34*, 105–113.
- Godoy, P., Reina, R., Calderón, A., Wittich, R.-M., García-Romera, I., and Aranda, E. (2016). Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *23*, 20985–20996.
- Gómez-Silván, C., Arévalo, J., Pérez, J., González-López, J., and Rodelas, B. (2013). Linking hydrolytic activities to variables influencing a submerged membrane bioreactor (MBR) treating urban wastewater under real operating conditions. *Water Res.* *47*, 66–78.
- González, I., Robledo-Mahón, T., Rodríguez-Calvo, A., Gutiérrez, M.C., Martín, M.Á., Chica, A.F., and Calvo, C. (2016). Evolution of the composting process with semi-permeable film technology at industrial scale. *J. Clean. Prod.* *115*, 245–254.
- Good, I.J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 237–264.
- Goyal, S., Dhull, S.K., and Kapoor, K.K. (2005). Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresour. Technol.* *96*, 1584–1591.
- Gramss, G., Günther, T.H., and Fritsche, W. (1998). Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. *Mycol. Res.* *102*, 67–72.
- Gu, W., Lu, Y., Tan, Z., Xu, P., Xie, K., Li, X., and Sun, L. (2017). Fungi diversity from different depths and times in chicken manure waste static aerobic composting. *Bioresour. Technol.* *239*, 447–453.
- Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y., and Shen, Y. (2012). Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresour. Technol.* *112*, 171–178.

- Gupta, K. V., Ali, I., Saleh, T. A., Nayak, A., and Agarwal, S. (2012). Chemical treatment technologies for waste-water recycling—an overview. *RSC Adv.* *2*, 6380–6388.
- Gupta, R., Beg, Q., and Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *59*, 15–32.
- Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O., and Biliaderis, D.C.G. (1995). Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *35*, 373–403.
- Hammami, A., Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Nasri, M., and Bayoudh, A. (2018). Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *Int. J. Biol. Macromol.* *108*, 56–68.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. (2001). PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. *Palaeontol. Electron.* *4*.
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K., and Wilhelm, M. (2011). Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Res.* *45*, 1358–1368.
- Hankin, L., and Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* *67*, 597–607.
- Harms, H., Schlosser, D., and Wick, L.Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 177–192.
- Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., and Boudabous, A. (2001). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* *80*, 217–225.
- He, Y., Xie, K., Xu, P., Huang, X., Gu, W., Zhang, F., and Tang, S. (2013). Evolution of microbial community diversity and enzymatic activity during composting. *Res. Microbiol.* *164*, 189–198.
- Heringa, S.D., Kim, J., Jiang, X., Doyle, M.P., and Erickson, M.C. (2010). Use of a mixture of bacteriophages for biological control of *Salmonella enterica* strains in compost. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 5327–5332.
- Hernández, T., Masciandaro, G., Moreno, J.I., and García, C. (2006). Changes in organic matter composition during composting of two digested sewage sludges. *Waste Manag.* *26*, 1370–1376.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., and Perez, D.R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* *146*, 2275–2289.

- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* *30*, 454–466.
- Hortenstine, C.C., and Rothwell, D.F. (1973a). Pelletized municipal refuse compost as a soil amendment and nutrient source for sorghum. *J. Environ. Qual.* *2*, 343–345.
- Illera, V., Walter, I., Souza, P., and Cala, V. (2000). Short-term effects of biosolid and municipal solid waste applications on heavy metals distribution in a degraded soil under a semi-arid environment. *Sci. Total Environ.* *255*, 29–44.
- IPPC, 2001. Climate change 2001, In: Houghton, J.T., Dung, Y., Griggs, D.J., Noguera, M., Van der Linden, P.J., Dui, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.), *The Scientific Basis. Contribution of Working Group I. Third Assessment Report of Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jalkute, C.B., Waghmare, S.R., Nadaf, N.H., Dhanavade, M.J., Jadhav, D.B., Pendhari, S.I., Patil, R.S., and Sonawane, K.D. (2017). Purification and characterization of SDS stable protease from *Bacillus safensis* strain CK. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* *10*, 91–95.
- Janshekar, H., Haltmeier, T., and Brown, C. (1982). Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 174–181.
- Javanbakht, V., Alavi, S. A., and Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Sci. Technol.* *69*, 1775–1787.
- Jayani, R.S., Saxena, S., and Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* *40*, 2931–2944.
- Jegannathan, K.R., and Nielsen, P.H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *J. Clean. Prod.* *42*, 228–240.
- Jones-Lepp, T.L., and Stevens, R. (2007). Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Anal. Bioanal. Chem.* *387*, 1173–1183.
- Jurado, M., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López-González, J.A., and Moreno, J. (2014). Exploiting composting biodiversity: study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresour. Technol.* *162*, 283–293.
- Kacprzak, M., Neczaj, E., Fijałkowski, K., Grobelak, A., Grosser, A., Worwag, M., Rorat, A., Brattebo, H., Almås, Å., and Singh, B.R. (2017). Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environ. Res.* *156*, 39–46.
- Karadag, D., Özkaya, B., Ölmez, E., Nissilä, M.E., Çakmakçı, M., Yıldız, Ş., and Puhakka, J.A. (2013). Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *77*, 85–90.

- Kauri, T., and Kushner, D.J. (1988). Detection of cellulolytic activity of bacteria and fungi growing on agar surfaces. *Biotechnol. Tech.* *2*, 149–152.
- Khare, S.K., Pandey, A., and Larroche, C. (2015). Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biochem. Eng. J.* *102*, 38–44.
- Kiely, G. (1999). *Ingeniería ambiental: fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión* (McGraw-Hill).
- Kızılkaya, R., and Bayraklı, B. (2005). Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *Appl. Soil Ecol.* *30*, 192–202.
- Ko, K.S., Kim, J.-M., Kim, J.-W., Jung, B.Y., Kim, W., Kim, I.J., and Kook, Y.-H. (2003). Identification of *Bacillus anthracis* by rpoB Sequence Analysis and Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 2908–2914.
- Kõljalg, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjøller, R., Larsson, E., *et al.* (2005). UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* *166*, 1063–1068.
- Kumar, C.G. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett. Appl. Microbiol.* *34*, 13–17.
- Kuroda, K., Nakada, N., Hanamoto, S., Inaba, M., Katayama, H., Do, A.T., Nga, T.T.V., Oguma, K., Hayashi, T., and Takizawa, S. (2015). Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam. *Sci. Total Environ.* *506–507*, 287–298.
- Kurtzman, C.P., and Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* *73*, 331–371.
- Ladd, J.N., and Butler, J.H.A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* *4*, 19–30.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., and Palleroni, N.J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 510–547.
- Langarica-Fuentes, A., Handley, P.S., Houlden, A., Fox, G., and Robson, G.D. (2014a). An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. *Fungal Ecol.* *11*, 132–144.
- Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., and Robson, G.D. (2014b). Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* *88*, 296–308.

- Langarica-Fuentes, A., Fox, G., and Robson, G.D. (2015). Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. *Microbiology* 161, 1921–1932.
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., and Domínguez, J. (2008). Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere* 72, 1013–1019.
- Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., et al. (2008). Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 46, 4011–4017.
- Leuschner, R.G., Kenneally, P.M., and Arendt, E.K. (1997). Method for the rapid quantitative detection of lipolytic activity among food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 237–240.
- Ley 22/2011 (2011). de la Jefatura del Estado, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados.
- Lima, J.A., Nahas, E., and Gomes, A.C. (1996). Microbial populations and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil. *Appl. Soil Ecol.* 4, 75–82.
- Lin, S.-Y., Hameed, A., Liu, Y.-C., Hsu, Y.-H., Lai, W.-A., and Young, C.-C. (2013). *Pseudomonas formosensis* sp. nov., a gamma-proteobacteria isolated from food-waste compost in Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3168–3174.
- Liu, D., Zhang, R., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., Yu, G., Xu, Z., and Shen, Q. (2011). Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff. *Bioresour. Technol.* 102, 9040–9049.
- Lloret, E., Pascual, J.A., Brodie, E.L., Bouskill, N.J., Insam, H., Juárez, M.F.-D., and Goberna, M. (2016). Sewage sludge addition modifies soil microbial communities and plant performance depending on the sludge stabilization process. *Appl. Soil Ecol.* 101, 37–46.
- López-González, J.A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Jurado, M.M., and Moreno, J. (2014). Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresour. Technol.* 175C, 406–416.
- López-González, J.A., Vargas-García, M. del C., López, M.J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. del M., and Moreno, J. (2015). Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresour. Technol.* 187, 305–313.
- Luo, W., Chen, T.B., Zheng, G.D., Gao, D., Zhang, Y.A., and Gao, W. (2008). Effect of moisture adjustments on vertical temperature distribution during forced-

- aeration static-pile composting of sewage sludge. *Resour. Conserv. Recycl.* *52*, 635–642.
- Ma, S., Fang, C., Sun, X., Han, L., He, X., and Huang, G. (2018). Bacterial community succession during pig manure and wheat straw aerobic composting covered with a semi-permeable membrane under slight positive pressure. *Bioresour. Technol.* *259*, 221–227.
- MacCready, J.S., Elbert, N.J., Quinn, A.B., and Potter, B.A. (2013). An assessment of bacterial populations in a static windrow compost pile. *Compost Sci. Util.* *21*, 110–120.
- Maliki, A.D., and Lai, K.-M. (2011). Design and application of a pre-composting test step to determine the effect of high fat food wastes on an industrial scale in-vessel composting system. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *65*, 906–911.
- Mao, J., and Guan, W. (2016). Fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Scopulariopsis brevicaulis* and its application in bioremediation of PAH-contaminated soil. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* *66*, 399–405.
- Martins, L.F., Antunes, L.P., Pascon, R.C., Oliveira, J.C.F. de, Digiampietri, L.A., Barbosa, D., Peixoto, B.M., Vallim, M.A., Viana-Niero, C., Ostroski, E.H., *et al.* (2013). Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. *PLOS ONE* *8*, e61928.
- Masters, G.M., Ela, W.P., and Montejano, J.M. (2008). *Introducción a la ingeniería medioambiental* (Pearson Educación. (No. 628 M315 2008
- Mayer, A.M., and Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* *60*, 551–565.
- Metcalf, E., and Eddy, H.P. (1991). *Wastewater Engineering: Treatment. Dispos. Reuse* *3*.
- Mhamdi, S., Bkhairia, I., Nasri, R., Mechichi, T., Nasri, M., and Kamoun, A.S. (2017). Evaluation of the biotechnological potential of a novel purified protease BS1 from *Bacillus safensis* S406 on the chitin extraction and detergent formulation. *Int. J. Biol. Macromol.* *104*, 739–747.
- Mohammad, F.G., and Alireza, T. (2007). Isolation and characterization of polyphenol oxidase- and peroxidase-producing *Bacillus* strains from fully fermented tea *Camellia sinensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *23*, 1327–1332.
- Mohammadi, K., Heidari, G., Khalesro, S., and Sohrabi. (2011). Soil management, microorganisms and organic matter interactions: A review. *Afr. J. Biotechnol.* *10*(86): 19840.

- Mondini, C., Fornasier, F., and Sinicco, T. (2004). Enzymatic activity as a parameter for the characterization of the composting process. *Soil Biol. Biochem.* *36*, 1587–1594.
- Moreno, C.J., and Mormeneo, B.S. (2008). Microbiología y bioquímica del proceso del compostaje. *Mundiprensa* *9*, 115–160.
- Morgenstern, I., Powlowski, J., Ishmael, N., Darmond, C., Marqueteau, S., Moisan, M.-C., Quenneville, G., and Tsang, A. (2012). A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biol.* *116*, 489–502.
- Nautiyal, C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* *170*, 265–270.
- Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., *et al.* (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 433–446.
- Neher, D.A., Weicht, T.R., Bates, S.T., Leff, J.W., and Fierer, N. (2013). Changes in bacterial and fungal communities across compost recipes, preparation methods, and composting times. *PLOS ONE* *8*, e79512.
- Nehete, P.N., Shah, V.D., and Kothari, R.M. (1985). Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. *Biotechnol. Lett.* *7*, 413–418.
- Nei, M., and Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics* (Oxford university press).
- Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R., and De heyder, B. (2004). Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *J. Hazard. Mater.* *106*, 83–92.
- Nikaeen, M., Nafez, A.H., Bina, B., Nabavi, B.F., and Hassanzadeh, A. (2015). Respiration and enzymatic activities as indicators of stabilization of sewage sludge composting. *Waste Manag.* *39*, 104–110.
- Nkoa, R. (2014). Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agron. Sustain. Dev.* *34*, 473–492.
- Olicón-Hernández, D.R., González-López, J., and Aranda, E. (2017). Overview on the biochemical potential of filamentous fungi to degrade pharmaceutical compounds. *Front. Microbiol.* *8*.

- Oliveira, P.L. de, Duarte, M.C.T., Ponezi, A.N., and Durrant, L.R. (2009). Purification and Partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.* *40*, 818–826.
- Oviedo-Ocaña, E.R., Torres-Lozada, P., Marmolejo-Rebellon, L.F., Hoyos, L.V., Gonzales, S., Barrena, R., Komilis, D., and Sanchez, A. (2015). Stability and maturity of biowaste composts derived by small municipalities: Correlation among physical, chemical and biological indices. *Waste Manag.* *44*, 63–71.
- Pandey, S.K., and Banik, R.M. (2011). Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresour. Technol.* *102*, 4226–4231.
- Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada, M., Hernandez, T., and Garcia, C. (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme Microb. Technol.* *57*, 1–7.
- PEMAR (2015). Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (2016-2022) del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Rubia, T. de la, and Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* *5*, 53–63.
- Perucci, P., and Scarponi, L. (1983). Effect of crop residue addition on arylsulphatase activity in soils. *Plant Soil* *73*, 323–326.
- PNIR (2009). Plan Nacional Integrado de Residuos de la Secretaría de Estado de Cambio Climático Para el período 2008-2015.
- Pochon, J., and Tardieux, P. (1962). *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. St. Mandé (Seine), France : Edition de la Tourelle.
- Rasapoor, M., Adl, M., and Pourazizi, B. (2016). Comparative evaluation of aeration methods for municipal solid waste composting from the perspective of resource management: A practical case study in Tehran, Iran. *J. Environ. Manage.* *184*, 528–534.
- Raut, M.P., Prince William, S.P.M., Bhattacharyya, J.K., Chakrabarti, T., and Devotta, S. (2008). Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste – A compost maturity analysis perspective. *Bioresour. Technol.* *99*, 6512–6519.
- RD 506/2013. Real Decreto 506/2013 del Ministerio de la Presidencia de 28 de junio de 2013, sobre productos fertilizantes.
- Research and Testing Laboratory (2014). Data Analysis Methodology. http://www.rtlgenomics.com/docs/Data_Analysis_Methodology.pdf.

- Reina, R., Kellner, H., Jehmlich, N., Ullrich, R., García-Romera, I., Aranda, E., and Liers, C. (2014). Differences in the secretion pattern of oxidoreductases from *Bjerkandera adusta* induced by a phenolic olive mill extract. *Fungal Genet. Biol.* *72*, 99–105.
- Rigopoulos, S., and Linke, P. (2002). Systematic development of optimal activated sludge process designs. *Comput. Chem. Eng.* *26*, 585–597.
- Roca-Pérez, L., Martínez, C., Marcilla, P., and Boluda, R. (2009). Composting rice straw with sewage sludge and compost effects on the soil-plant system. *Chemosphere* *75*, 781–787.
- Ros, M., García, C., and Hernández, T. (2006). A full-scale study of treatment of pig slurry by composting: Kinetic changes in chemical and microbial properties. *Waste Manag.* *26*, 1108–1118.
- Rosario K., Nilsson Christina, Lim Yan Wei, Ruan Yijun, and Breitbart Mya (2009). Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ. Microbiol.* *11*, 2806–2820.
- Rosen, B.I. (2003). VI, 2. Molecular characterization and epidemiology of picobirnaviruses. In *Perspectives in Medical Virology*, (Elsevier), pp. 633–644.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Lundell, T., Floudas, D., Nagy, L.G., Barrasa, J.M., Hibbett, D.S., and Martínez, A.T. (2013). Lignin-degrading peroxidases in *Polyporales*: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia* *105*, 1428–1444.
- Rulkens, W. (2008). Sewage Sludge as a Biomass Resource for the Production of Energy: Overview and Assessment of the Various Options. *Energy Fuels* *22*, 9–15.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., and Swings, J. (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.* *94*, 127–137.
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Tham, M.-L.D., and Albiñ, A. (2004). Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* *38*, 1989–1994.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Varga, J., and Frisvad, J.C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssosclamyces* and its *Phaecilomyces* anamorphs. *Persoonia* *22*, 14–27.
- Sánchez-Monedero, M.A., Mondini, C., de Nobili, M., Leita, L., and Roig, A. (2004). Land application of biosolids. Soil response to different stabilization degree of the treated organic matter. *Waste Manag.* *24*, 325–332.
- Sardans, J., and Peñuelas, J. (2005). Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biol. Biochem.* *37*, 455–461.

- Sarkar, S., Banerjee, R., Chanda, S., Das, P., Ganguly, S., and Pal, S. (2010). Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting. *Bioresour. Technol.* *101*, 2892–2895.
- Scaglia, B., Orzi, V., Artola, A., Font, X., Davoli, E., Sanchez, A., and Adani, F. (2011). Odours and volatile organic compounds emitted from municipal solid waste at different stage of decomposition and relationship with biological stability. *Bioresour. Technol.* *102*, 4638–4645.
- Scaglia, B., D'Imporzano, G., Garuti, G., Negri, M., and Adani, F. (2014). Sanitation ability of anaerobic digestion performed at different temperature on sewage sludge. *Sci. Total Environ.* *466–467*, 888–897.
- Schallmeyer, M., Singh, A., and Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* *50*, 1–17.
- Schultz, M.M., Higgins, C.P., Huset, C.A., Luthy, R.G., Barofsky, D.F., and Field, J.A. (2006). Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility. *Environ. Sci. Technol.* *40*, 7350–7357.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., and Dijck, P. van (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *59*, 426–435.
- Shallom, D., and Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 219–228.
- Sharma, A.K., Sharma, V., Saxena, J., Yadav, B., Alam, A., and Prakash, A. (2015). Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil. *Int J Sci Res Env. Sci* *3*, 0334–0340.
- Sharma, N., Rathore, M., and Sharma, M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* *12*, 45–60.
- Shen, X.-H., Zhou, N.-Y., and Liu, S.-J. (2012). Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum* another potential for applications for this bacterium? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *95*, 77–89.
- Shin, S.-K., Hwang, C.Y., Cho, Y.-J., and Yi, H. (2015). Reclassification of *Serpens flexibilis* Hespell 1977 as *Pseudomonas flexibilis* comb. nov., with *Pseudomonas tuomuerensis* Xin *et al.* 2009 as a later heterotypic synonym. *Syst. Appl. Microbiol.* *38*, 563–566.
- Sidhu, J.P.S., and Toze, S.G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* *35*, 187–201.
- Siles, J.A., González-Menéndez, V., Platas, G., Sampedro, I., García-Romera, I., and Bills, G.F. (2014). Effects of dry olive residue transformed by *Coriolopsis floccosa* (*Polyporaceae*) on the distribution and dynamic of a culturable fungal soil community. *Microb. Ecol.* *67*, 648–658.

- Singh, R.P., and Agrawal, M. (2008). Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Manag.* *28*, 347–358.
- Skujiņš, J., and Burns, R.G. (1976). Extracellular enzymes in soil. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* *4*, 383–421.
- Song, Y.-C., Kwon, S.-J., and Woo, J.-H. (2004). Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic-and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Res.* *38*, 1653–1662.
- Soriano-Disla, J.M., Gómez, I., Navarro-Pedreño, J., and Jordán, M.M. (2014). The transfer of heavy metals to barley plants from soils amended with sewage sludge with different heavy metal burdens. *J. Soils Sediments* *14*, 687–696.
- Stasinakis, A.S. (2012). Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* *121*, 432–440.
- Steger, K., Eklind, Y., Olsson, J., and Sundh, I. (2005). Microbial community growth and utilization of carbon constituents during thermophilic composting at different oxygen levels. *Microb. Ecol.* *50*, 163–171.
- Storey, S., Chualain, D.N., Doyle, O., Clipson, N., and Doyle, E. (2015). Comparison of bacterial succession in green waste composts amended with inorganic fertiliser and wastewater treatment plant sludge. *Bioresour. Technol.* *179*, 71–77.
- Straub, T.M., Pepper, I.L., and Gerba, C.P. (1993). Hazards from pathogenic microorganisms in land-disposed sewage sludge. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* *132*, 55–91.
- Strauch, D. (1991). Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* *10*, 813–846.
- Strauss, M. I. a., Jolly, N. p., Lambrechts, M. g., and Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* *91*, 182–190.
- Sun, W., Yu, G., Louie, T., Liu, T., Zhu, C., Xue, G., and Gao, P. (2015). From mesophilic to thermophilic digestion: the transitions of anaerobic bacterial, archaeal, and fungal community structures in sludge and manure samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *99*, 10271–10282.
- Tabatabai, M.A. (1994). Soil enzymes. *Methods Soil Anal. Part 2—Microbiological Biochem. Prop.* 775–833.
- Tabatabai, M.A., and Bremner, J.M. (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* *34*, 225–229.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 2725–2729.
- Taylor, C.R., Hardiman, E.M., Ahmad, M., Sainsbury, P.D., Norris, P.R., and Bugg, T.D.H. (2012). Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* *113*, 521–530.
- Tejada, M., Garcia, C., Gonzalez, J.L., and Hernandez, M.T. (2006). Use of organic amendment as a strategy for saline soil remediation: Influence on the physical, chemical and biological properties of soil. *Soil Biol. Biochem.* *38*, 1413–1421.
- The US Department of Agriculture, The US Composting Council. Test Methods for the Examination of Composting and Compost (TMECC). Edaphos International Houston, TX.
- Tiago, I., Teixeira, I., Silva, S., Chung, P., Veríssimo, A., and Manaia, C.M. (2004). Metabolic and genetic diversity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from composted municipal sludge on poly- ϵ -caprolactones. *Curr. Microbiol.* *49*, 407–414.
- Tiquia, S.M. (2002). Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J. Appl. Microbiol.* *92*, 764–775.
- Tiquia, S. M. (2005). Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *J. Appl. Microbiol.* *99*, 816–828.
- Tortosa, G., Castellano-Hinojosa, A., Correa-Galeote, D., and Bedmar, E.J. (2017). Evolution of bacterial diversity during two-phase olive mill waste (“alperujo”) composting by 16S rRNA gene pyrosequencing. *Bioresour. Technol.* *224*, 101–111.
- Touahar, I.E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J.-P., and Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* *481*, 90–99.
- Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., and Ostle, N. (2002). β -Glucosidase activity in pasture soils. *Appl. Soil Ecol.* *20*, 157–162.
- USEPA (2003). Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. No. EPA/625/R-92/013). United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Risk Management Laboratory, Center for Environmental Research Information, Cincinnati, OH.
- Vallini, G., and Pera, A. (1985). Technological aspects of composting including modelling and microbiology. In *Composting of Agricultural and Other Wastes*, (Elsevier Applied Science London and New York), p.

- Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J., and Moreno, J. (2010). Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Manag.* *30*, 771–778.
- Verlicchi, P., and Zambello, E. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil — A critical review. *Sci. Total Environ.* *538*, 750–767.
- Villar, I., Alves, D., Garrido, J., and Mato, S. (2016). Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. *Waste Manag.* *54*, 83–92.
- Wang, K., Mao, H., and Li, X. (2018). Functional characteristics and influence factors of microbial community in sewage sludge composting with inorganic bulking agent. *Bioresour. Technol.* *249*, 527–535.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 5261–5267.
- Watanabe, K., Nagao, N., Toda, T., and Kurosawa, N. (2009). The dominant bacteria shifted from the order *Lactobacillales* to *Bacillales* and *Actinomycetales* during a start-up period of large-scale, completely-mixed composting reactor using plastic bottle flakes as bulking agent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *25*, 803–811.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* *173*, 697–703.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.-P., and Godon, J.-J. (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res.* *42*, 53–62.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. Guide Methods Appl.* *18*, 315–322.
- Wright, C., Gryganskyi, A.P., and Bonito, G. (2016). Fungi in Composting. In *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology*, (Springer, Cham), pp. 3–28.
- Wu, X., Conkle, J.L., Ernst, F., and Gan, J. (2014). Treated wastewater irrigation: uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions. *Environ. Sci. Technol.* *48*, 11286–11293.
- Xiao, Y., Zeng, G.-M., Yang, Z.-H., Ma, Y.-H., Huang, C., Xu, Z.-Y., Huang, J., and Fan, C.-Z. (2011). Changes in the actinomycetal communities during continuous thermophilic composting as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative PCR. *Bioresour. Technol.* *102*, 1383–1388.

- Xie, J., Li, S., Mo, C., Xiao, X., Peng, D., Wang, G., and Xiao, Y. (2016). Genome and Transcriptome Sequences Reveal the Specific Parasitism of the Nematophagous *Purpureocillium lilacinum* 36-1. *Front. Microbiol.* *7*.
- Yang, L., Zhang, S., Chen, Z., Wen, Q., and Wang, Y. (2016). Maturity and security assessment of pilot-scale aerobic co-composting of penicillin fermentation dregs (PFDs) with sewage sludge. *Bioresour. Technol.* *204*, 185–191.
- Zainudin, M.H.M., Hassan, M.A., Tokura, M., and Shirai, Y. (2013). Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocellulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge. *Bioresour. Technol.* *147*, 632–635.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014a). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *30*, 614–620.
- Zhang, L., Jia, Y., Zhang, X., Feng, X., Wu, J., Wang, L., and Chen, G. (2016). Wheat straw: An inefficient substrate for rapid natural lignocellulosic composting. *Bioresour. Technol.* *209*, 402–406.
- Zhang, T., Shao, M.-F., and Ye, L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.* *6*, 1137–1147.
- Zhang, X., Zhong, Y., Yang, S., Zhang, W., Xu, M., Ma, A., Zhuang, G., Chen, G., and Liu, W. (2014b). Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. *Bioresour. Technol.* *170*, 183–195.
- Zhou, H.-B., Ma, C., Gao, D., Chen, T.-B., Zheng, G.-D., Chen, J., and Pan, T.-H. (2014). Application of a recyclable plastic bulking agent for sewage sludge composting. *Bioresour. Technol.* *152*, 329–336.

8. Material suplementario

Anexo I

Normativa aplicable al compost de lodos de depuradora

La normativa aplicable al compostaje a partir de lodos de depuradora debe cumplir con el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. En este contexto, el compost a partir de lodos de depuradora es clasificado como enmienda orgánicas (Grupo 6). Por tanto, debe cumplir lo que se detalla en el Anexo I del RD 506/2013. Recientemente se ha publicado el RD 999/2017 sobre Productos Fertilizantes, pero los parámetros relativos a este grupo no se han modificado. Los criterios aplicables a los productos fertilizantes elaborados con residuos y otros componentes orgánicos se recogen en el Anexo V del RD 506/2013 y se resumen a continuación:

Debe cumplir con los siguientes parámetros:

- Materia orgánica total (%) < 35
- Humedad máxima (%) < 40
- C/N < 20

Además de estos parámetros, el etiquetado deberá ir acompañado de la siguiente información:

- -pH, CE, C/N, humedad mínima y máxima.
- -Materias primas utilizadas
- -Tratamiento y proceso de elaboración
- Materia orgánica total
- C orgánico
- N total (si >1%)
- N orgánico (si >1%)
- P₂O₅ TOTAL (si >1%)
- K₂O P₂O
- Ácidos húmicos

- Granulometría
- No podrá contener impurezas (vidrio, piedras, gravas, metales, plásticos, etc.)
- El 90% de las partículas pasarán por la malla de 25 mm.

Los productos que contengan materias primas de origen orgánico, animal o vegetal, no podrán superar los valores máximos de microorganismos incluidos en el anexo V.

En los productos con componentes orgánicos (Anexo V), deberá indicarse la clasificación a que corresponda (A, B ó C), de acuerdo con dicho Anexo y añadirse: "Contenido en metales pesados inferior a los límites autorizados para esta clasificación".

Anexo II

El análisis bioinformático se realizó con QIIME 1.9.1 y se detalla a continuación con los comandos (>script) usados.

Las secuencias en formato FASTA se analizaron previamente con el software FastaQC, para comprobar la calidad y el número de secuencias obtenidas en cada muestra. En este caso los datos del RTL Genomic vienen separados por cada muestra (demultiplex) y las secuencias de los dos cebadores separadas (forward y reverse).

1. Solapamiento de los cebadores para cada muestra.

Para unir las secuencias de ambos cebadores se utilizó el comando que se describe a continuación, tomando los archivos de entrada proporcionados por el servicio de secuenciación (RTL, genomics) R1 para el forward y R2 reverse.

```
>join_paired_ends.py -f archivofastaq_primercebador_R1.fastq -r  
archivofasta_segundocebador_R2.fastq -o nombre_carpeta_salida1/
```

En este paso se obtuvo una carpeta en la que se encuentra un nuevo archivo FASTA con la secuencia de nuestra muestra con ambos cebadores unidos.

2. Conversión a archivo FASTA

Una vez comprobada la calidad en pasos previos, el archivo FASTAQ con ambos cebadores unidos, se separó en dos archivos: el fna y el qual, con el siguiente comando:

```
>convert_fastaqual_fastq.py -f secuenciamuestrax.fastq -c  
fastq_to_fastaqual -o nombre_carpeta_salida2/
```

A continuación se agruparon los archivos de extensión fna (FASTA) en una nueva carpeta "FASTA".

3. Creación del mapping_file.txt

Para unir todas las muestra en un único archivo se asoció cada archivo fna (FASTA) a un archivo txt denominado mapping_file.

SampleID	BarcodeSeq	LinkerPrime	SampleType	Year	Month	Day	Subject	Stage	DaysSinceE	InputFileNar	Description
1	AGTGTGAC	GTGCCAGC	lodo	2013	nov	0		1	starting mate	0	se.join.fastq SEW
2	ATGGCAGC	GTGCCAGC	bulking	2013	nov	0		2	starting mate	0	bu.join.fastq BUL
3	CTGAGATA	GTGCCAGC	tiempo 1	2013	nov	1		2	cover	84	C1.join.fastq C1
4	ACTAGTTC	GTGCCAGC	tiempo 2	2013	nov	2		1	cover	112	C2.join.fastq C2
5	AGTGCAT	GTGCCAGC	tiempo 5	2013	nov	5		1	cover	140	C5.join.fastq C5
6	CCGACTG	GTGCCAGC	tiempo 8	2013	nov	8		2	cover	140	C8.join.fastq C8
7	CCTCTCGT	GTGCCAGC	tiempo 14	2013	nov	14		2	cover	168	C14.join.fastq C14
8	CATATCC	GTGCCAGC	tiempo 30	2013	dic	30		2	uncover	0	C30.join.fastq C30
9	ACGATGCC	GTGCCAGC	tiempo 40	2013	dic	40		1	uncover	84	C40.join.fastq C40
10	CGTGATT	GTGCCAGC	tiempo 70	2014	ene	70		2	uncover	84	C70.join.fastq C70
11	AGCTATCC	GTGCCAGC	tiempo 120	2014	mar	120		1	uncover	112	C120.join.fastq C120

Para validar el mapping_file se utilizó el siguiente script:

```
>validate_mapping_file.py -m mapping_file.txt -o mapping_file_validate
=validate_mapping_file
```

4. Creación de un archivo fna a partir del mapping_file

Para asociar el mapping file a las muestras, todos los archivos FASTA se incluyeron en una misma carpeta y este fue validado.

```
>add_qiime_labels.py -i fasta/ -m mapping_file_validate.txt -c
InputFileName -o nombre_carpeta_salida3/
```

Esta carpeta contendrá un nuevo archivo fna (FASTA) denominado 'combined_seqs.fna' con todas las muestras.

5. Selección de los OTUs representativos 'picking otu' con la estrategia 'open_reference' y el método USEARCH:61 para la eliminación de quimeras.

En el caso de bacterias, la base de datos del ARNr 16S empleada fue Greengenes:

```
>pick_open_reference_otus.py -i combined_seqs.fna -o open_reference/ -r
/macqiime/anaconda/lib/python2.7/site-packages/qiime_default_reference/gg_13_8_otus/rep_set/97_otus.fasta -m
usearch61
```

En el caso de hongos, se empleó UNITE para la región ITS.

```
>pick_open_reference_otus.py -i combined_seqs.fna -r
/macqiime/anaconda/lib/python2.7/site-
packages/its_12_11_otus/rep_set/97_otus.fasta -m usearch61 -o open-
ref/< -p /macqiime/anaconda/lib/python2.7/site-
packages/its_12_11_otus/params.txt
```

En este paso se obtuvo la tabla de OTUs en formato biom.

6. Conversión de tabla biom en txt.

```
>biom convert -i otu_table_mc2_w_tax.biom -o otu_table_mc2_w_tax.txt -
-to-tsv --table-type 'OTU table' --header-key taxonomy
```

7. Resumen de la tabla generada en el picking OTU.

```
>biom summarize-table -i otu_table.biom -o otu_table_sumarize.txt
```

8. Cálculo de las curvas de rarefacción

```
>alpha_rarefaction.py -i otu_table_ -m mapping_file_validate.txt -t
/macqiime/anaconda/lib/python2.7/site-
packages/qiime_default_reference/gg_13_8_otus/trees/97_otus.tree -o
rarefaction-singleton/
```

9. Determinación de la alpha-diversidad y beta diversidad

Alpha diversidad en la comunidad bacteriana:

```
>alpha_diversity.py -i otu_table_singletons.biom -o
otu_table_singletons_alpha.txt -t
/macqiime/anaconda/lib/python2.7/site-
packages/qiime_default_reference/gg_13_8_otus/trees/97_otus.tree -m
"PD_whole_tree,ace,berger_parker_d,brillouin_d,chaol,chaol_ci,dominanc
e,doubles,enspie,equitability,esty_ci,fisher_alpha,gini_index,goods_co
verage,heip_e,kempton_taylor_q,margalef,mcintosh_d,mcintosh_e,menhnic
k,michaelis_menten_fit,observed_otus,observed_species,osd,simpson_reci
procal,robbins,shannon,simpson,simpson_e,singles,strong"
```

Beta diversidad en la comunidad bacteriana:

```
>beta_diversity_through_plots.py -i otu_table.biom -o betadivesity/ -t
/macqiime/anaconda/lib/python2.7/site-
```

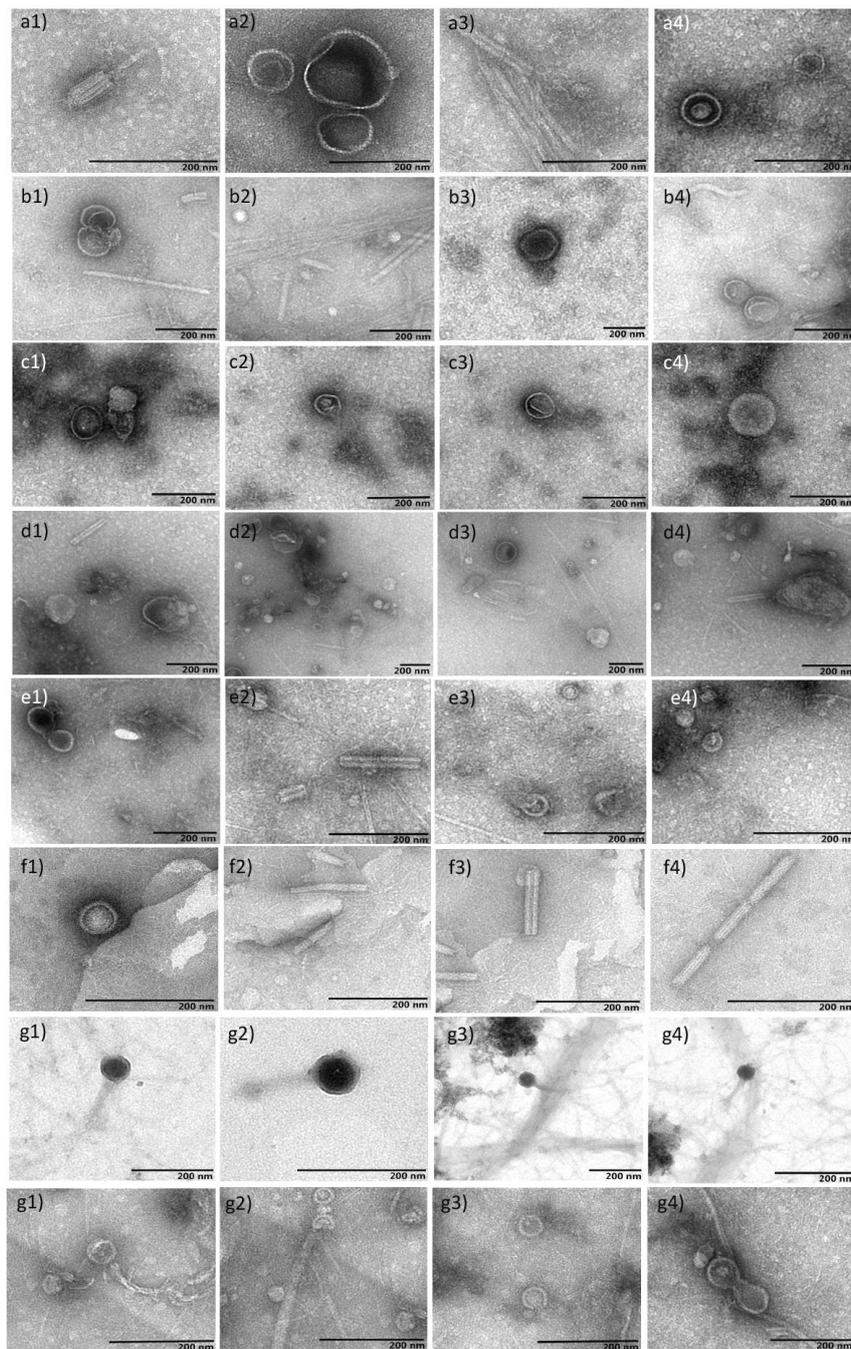
```
packages/qiime_default_reference/gg_13_8_otus/trees/97_otus.tree -m  
mapping_file_validate.txt
```

En la comunidad fúngica, para la región ITS alpha y beta diversidad se calcularon con el mismo comando:

```
>core_diversity_analyses.py -i otu_table_.biom -o  
cdout//Users/Taroma/Desktop/LBLdata/fungi_Calvo_4345Raw02222016/  
mapping_file_validate.txt -e 353 --nonphylogenetic_diversity
```

Anexo III

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en el lodo de depuradora y en distintos tiempos del proceso de compostaje de la Pila II. Diversidad de las partículas virales en el lodo (a1-a4), tiempo 0 (b1-b4), tiempo 2 días (c1-c4), 5 días (d1-d4), 8 días (e1-e4), 15 días (f1-f4), 40 días (g1-g4), 70 días (h1-h4) (la línea de la escala corresponde a 200 nm).



Abreviaturas

- ADN: ácido dexoxirribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNr: ARN ribosómico
- BTEX: benceno, tolueno, etileno y xileno
- CGMMV: virus del mosaico y moteado verde del pepino
- CEE: Comunidad Económica Europea
- CI: carbono inorgánico
- CT: carbono total
- COT: carbono orgánico total
- COV: compuestos orgánicos volátiles
- COx: carbono orgánico oxidable
- dNTPs: mezcla de desoxinucleótidos
- EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales
- DBO: demanda biológica de oxígeno
- DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
- DQO: demanda química de oxígeno
- ITS: región intergénica del ARNr de las células eucariotas
- MO: materia orgánica
- NMDS: Escalamiento multidimensional no métrico
- TEM: microscopía electrónica de transmisión
- TGGE: electroforesis en gel con gradiente de temperatura
- TCA: ácido tricloroacético
- TFF: trifeníl formazán
- TSA: tripticasa soja agar
- TTC: cloruro trifeníl tetrazolio
- MEA: extracto de malta y agar
- NTK: Nitrógeno Kjeldahl total
- OTU: operational taxonomic unit/unidad taxonómica operacional

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDA: patata dextrosa agar

PEG: polietilenglycol

PNF: *p*-nitrofenol

PMMoV: virus del mosaico y moteado verde del pimiento

Ppm: partes por millón

PCoA: Análisis de las coordenadas principales

RD: Real Decreto

Rpm: revoluciones por minuto

RSV: virus del sarcoma de Rous

SM: sólidos minerales

SS: sólidos en suspensión

ST: sólidos totales

TAE: Tris acetato-EDTA

TSB: caldo tripticasa soja

UFC: unidades formadoras de colonias

USEPA: Unites States Environmental Protection Agency

QIIME: siglas del software Quantitative Insights into Microbial Ecology, canonically pronounced "*chime*."

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Principales microorganismos patógenos en lodos (Déportes <i>et al.</i> , 1995).....	13
Tabla 1.2. Tabla de contaminantes orgánicos e inorgánicos en lodos procedentes de las aguas residuales. Adaptado de Barceló y López (2008).....	15
Tabla 3.1. Tiempos de muestreo y fases del proceso de compostaje realizado en las Pilas I y II.	46
Tabla 3.2. Metodología empleada para la determinación cualitativa extracelular.....	63
Tabla 4.1. Propiedades físico-químicas del material de partida (lodo y estructurante vegetal) y de las muestras a lo largo del proceso de compostaje de la Pila I. CE: conductividad eléctrica; %H: porcentaje de humedad; %COx: porcentaje de carbono orgánico oxidable; %MO: porcentaje de materia orgánica; %SV: porcentaje de sólidos volátiles; %NTK: porcentaje de nitrógeno Kjeldahl total; C/N: relación carbono-nitrógeno; %P ₂ O ₅ : porcentaje de fósforo; %CT: porcentaje de carbono total; %CI: porcentaje de carbono inorgánico. Los valores representan el promedio de 3 réplicas ± el error absoluto.	69
Tabla 4.2. Contenido en metales pesados en las muestras durante el proceso de compostaje de la Pila I.....	72
Tabla 4.3. Determinación de los microorganismos patógenos en la Pila I.....	73
Tabla 4.4. Enumeración de la microbiota bacteriana y fúngica en el material a compostar de la Pila I (Log UFC g ⁻¹). El error se estimó con la desviación estándar de tres repeticiones.....	73
Tabla 4.5. Bacterias aisladas e identificadas en el material de partida y las distintas muestras durante el proceso de compostaje de la Pila I. Se muestra la procedencia de los aislados identificados y su similitud (porcentaje de identidad) con la base de datos del NCBI (número de acceso).....	76
Tabla 4.6. Estimación de la α -diversidad de los datos obtenidos por la secuenciación masiva con Illumina MiSeq en la Pila I.....	84
Tabla 4.7. Parámetros físico-químicos determinados en el material de partida (lodo y estructurante vegetal) y en los muestreos del proceso de compostaje de la Pila	

II. CE: conductividad eléctrica; %H: porcentaje de humedad; %COx: porcentaje de carbono orgánico oxidable; %MO: porcentaje de materia orgánica; %SV: porcentaje de sólidos volátiles; %NTK: porcentaje de nitrógeno Kjeldahl total; C/N: relación carbono-nitrógeno; %P ₂ O ₅ : porcentaje de fósforo; %CT: porcentaje de carbono total; %CI: porcentaje de carbono inorgánico. Los valores representan el promedio de 3 réplicas ± el error absoluto.....	96
Tabla 4.8. Contenido en metales pesados en el material de partida y en las muestras durante el proceso de compostaje de la Pila II.....	98
Tabla 4.9. Determinación de los microorganismos patógenos en la Pila II.....	99
Tabla 4.10. Enumeración de la microbiota bacteriana y fúngica en el material a compostar de la Pila II (Log UFC g ⁻¹). El error se estimó con la desviación típica de tres repeticiones.....	99
Tabla 4.11. Estimación de la α -diversidad de los datos obtenidos mediante secuenciación masiva con Illumina MiSeq en la Pila II.....	106
Tabla 4.12. Estimación de la α diversidad de los datos obtenidos mediante secuenciación masiva usando Illumina MiSeq para las comunidades fúngicas de la Pila II.....	114
Tabla 4.13. Producción de actividades enzimáticas extracelulares, identificación filogenética, porcentaje de identidad y número de acceso en el GenBank de las bacterias aisladas en la Pila II. (Positivo  Negativo ).....	137
Tabla 4.14. Producción de actividades enzimáticas extracelulares, identificación filogenética, porcentaje de identidad y número de acceso en el GenBank de los hongos aislados en la Pila II. (Positivo  Negativo ).....	149

Índice de figuras

Figura 1.1. Esquema general de las líneas de tratamiento de aguas residuales en una Estación depuradora de agua residual (EDAR).....	8
Figura 1.2. Esquema del tratamiento del lodo. Adaptado de Verlicchi y Zambello, (2015).....	11
Figura 1.3. Porcentajes de los destinos finales del lodo en 2012 en España en comparación con los objetivos marcados por el Plan Nacional Integrado de Residuos para el período 2008-2015. Adaptado del PNIR (2009).....	17
Figura 1.4. Sucesión microbiana y evolución del proceso de compostaje. Adaptado de Moreno y Mormeneo (2008).....	27
Figura 3.1. Imágenes del montaje de la pila en la planta de biosólidos "El Salao". Pila descubierta (a) y pila con cubierta Gore-Tex® (b).....	43
Figura 3.2. Conductos de aireación en el suelo (a). Ampliación de la tubería (b). Ventilador para suministrar aireación a la pila (c). Conexión del ventilador a la pila (d).....	44
Figura 3.3. Sondos para la monitorización de las temperaturas conectadas a la pila (a) y cubrición de la pila de compostaje (b).....	45
Figura 3.4. Imágenes del material a compostar de la Pila II, lodo (a) y estructurante vegetal (b).....	45
Figura 3.5. Esquema de las regiones del gen ARNr 16S de bacterias y localización de los cebadores.....	55
Figura 3.6 Esquema del ARN fúngico y los cebadores correspondientes en cada región.....	57
Figura 4.1. Evolución de la temperatura a lo largo del proceso de compostaje de la Pila I medido con una sonda a 0 cm, 25 cm, 75 cm y 100 cm de profundidad en la Pila I.....	67
Figura 4.2. Evolución de la microbiota bacteriana durante el proceso de compostaje de la Pila I expresados como Log UFC g ⁻¹ . Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....	74

- Figura 4.3. Evolución de la microbiota fúngica durante el proceso de compostaje de la pila I expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....75
- Figura 4.4. Porcentajes de abundancia relativa a nivel de orden de los aislados bacterianos obtenidos a lo largo del proceso de compostaje en la Pila I mediante identificación con el gen del ARNr 16S.....77
- Figura 4.5. Árbol filogenético de las bacterias aisladas e identificadas mediante secuenciación del gen ARNr 16S obtenido mediante el método Neighbour-joining. Los números de acceso corresponden a las secuencias homólogas obtenidas en el NCBI. La barra indica un 5% de divergencia. Los valores obtenidos por debajo de 50% no se muestran en el árbol.....78
- Figura 4.6. Evolución de las actividades enzimáticas de la Pila I. Deshidrogenasa a); proteasa b); fosfatasa ácida c); fosfatasa alcalina d); β-glucosidasa e) y arilsulfatasa f). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....80
- Figura 4.7. Porcentajes de abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de orden determinado mediante Illumina MiSeq de la Pila I. La categoría *unknown* se asignó cuando el algoritmo utilizado en la asignación taxonómica (USEARCH) no permitió establecer un nivel taxonómico con un nivel de confianza fiable a partir de 6 coincidencias. La categoría *unclassified* se asignó en los casos en los que la base de datos no contenía información suficiente para llegar a ese nivel taxonómico. La categoría *No Hit* significa que no hubo coincidencia con la base de datos utilizada en la asignación taxonómica. En la categoría Abundancia < 1% se incluyeron todos los órdenes con porcentajes inferiores al 1% en todas las muestras.....86
- Figura 4.8. Análisis de la composición de la comunidad bacteriana del proceso de compostaje bajo cubierta semipermeable a nivel de familia. La categoría *unknown* se asignó cuando el algoritmo utilizado en la asignación taxonómica (USEARCH) no permitió establecer ese nivel taxonómico con un nivel de confianza fiable (a partir de 6 coincidencias). La categoría *unclassified* se asignó

en los casos en los que la base de datos no contenía información suficiente para llegar a de ese nivel taxonómico. La categoría *No Hit* significa que no hubo coincidencia con la base de datos utilizada en la asignación taxonómica. En la categoría Abundancia < 1% se incluyeron todos los órdenes con porcentajes inferiores al 1% en todas las muestras.....88

Figura 4.9. Escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS) de la distribución de las muestras de compostaje en función en función de las abundancias relativas a nivel de orden de las comunidades bacterianas. Las burbujas representan la abundancia relativa de los órdenes predominantes (*Bacillales* y *Actinomycetales*). Los vectores representan el rango de correlación de Spearman de los factores ambientales y de las actividades enzimáticas con el MDS. Los vectores rojos representan los factores ambientales: porcentaje de fósforo (%P₂O₅); relación carbono-nitrógeno (C/N); porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total (%NTK); porcentaje de humedad (%M); porcentaje de material orgánica (%MO); porcentaje de carbono orgánico total (%COT); temperatura (T); porcentaje de carbono inorgánico (%CI). Los vectores negros representan las actividades enzimáticas determinadas: arilsulfatasa (Aril); β-glucosidasa (β-glu); deshidrogenasa (Desh); fosfatasa alcalina (FosAlc) y fosfatasa ácida (FosAc).....90

Figura 4.10. Evolución de la temperatura a lo largo del proceso de compostaje medido con una sonda a 0 cm, 25 cm, 75 cm y 100 cm de profundidad en la Pila II.....94

Figura 4.11. Evolución de la microbiota bacteriana durante el proceso de compostaje de las Pila II expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....100

Figura 4.12. Evolución de la microbiota fúngica durante el proceso de compostaje de la Pila II expresados como Log UFC g⁻¹. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....101

Figura 4.13. Evolución de la actividad enzimática durante el proceso de compostaje de la Pila II: Deshidrogenasa a); proteasa b); fosfatasa ácida c); fosfatasa alcalina d);

	β-glucosidasa e) y arilsulfatasa f). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.....	103
Figura 4.14.	Análisis de los componentes principales (PCoA) basado en el algoritmo UniFrac de la comunidad bacteriana de las distintas muestras del proceso de compostaje de la Pila II.....	107
Figura 4.15.	Porcentajes de abundancia relativa de la comunidad bacteriana a nivel de orden determinado mediante Illumina MiSeq de la Pila II. Las categorías que no fueron clasificadas al nivel de orden con un nivel de confianza fiable se le asignaron su nivel taxonómico superior.....	109
Figura 4.16.	Evolución del porcentaje de señal de las comunidades bacterianas exclusivas del material de partida (lodo y estructurante vegetal) a lo largo del proceso de compostaje de la Pila II analizado mediante Source Tracker.....	111
Figura 4.17.	Análisis de los componentes principales (PCoA) mediante Bray-Curtis de las comunidades fúngicas de las distintas muestras del proceso de compostaje de la Pila II.....	115
Figura 4.18.	Porcentajes de abundancia relativa de la comunidad fúngica a nivel de orden determinado mediante Illumina MiSeq de la Pila II. Las categorías que no fueron clasificadas al nivel de orden con un nivel de confianza fiable se le asignaron su nivel taxonómico.....	117
Figura 4.19.	Evolución del porcentaje de señal de las comunidades fúngicas exclusivas del material de partida (lodo y estructurante vegetal) a lo largo del proceso de compostaje de la Pila II analizado mediante Source Tracker.....	120
Figura 4.20.	Escalado multidimensional no-métrico (NMDS) de la distribución de las muestras de compostaje, basado en las abundancias relativas a nivel de orden de las comunidades bacterianas (NMDS). Las burbujas representan la temperatura (°C) de los distintos tiempos del proceso. Los vectores representan la correlación de Spearman y la influencia direccional de los factores ambientales y de las actividades enzimáticas en la distribución de las muestras de abundancia relativa del proceso de compostaje. Los vectores verdes representan las actividades enzimáticas determinadas: deshidrogenasa (Des);	

proteasa (Prot); fosfatasa ácida (FosAc); fosfatasa alcalina (FosAlc); β -glucosidasa (β -glu) y arilsulfatasa (Ari). Los vectores azules representan los factores ambientales: porcentaje de fósforo ($\%P_2O_5$); relación carbono-nitrógeno (C/N); porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total ($\%N_{TK}$); porcentaje de humedad ($\%H$); porcentaje de material orgánica ($\%MO$); porcentaje de carbono orgánico total ($\%COT$); temperatura (T); porcentaje de carbono inorgánico ($\%CI$). Los parámetros resultantes del análisis BEST está marcado con un asterisco (*).....122

Figura 4.21. Escalado multidimensional no-métrico (NMDS) de la distribución de las muestras de compostaje, basado en las abundancias relativas a nivel de orden de las comunidades fúngicas. Las burbujas representan la temperatura ($^{\circ}C$) de los distintos tiempos del proceso. Los vectores representan la correlación de Spearman y la influencia direccional de los factores ambientales y de las actividades enzimáticas en la distribución de las muestras de abundancia relativa del proceso de compostaje. Los vectores verdes representan las actividades enzimáticas determinadas: deshidrogenasa (Des); proteasa (Prot); fosfatasa ácida (FosAc); fosfatasa alcalina (FosAlc); β -glucosidasa (β -glu) y arilsulfatasa (Ari). Los vectores azules representan los factores ambientales: porcentaje de fósforo ($\%P_2O_5$); relación carbono-nitrógeno (C/N); porcentaje de Nitrógeno Kjeldahl Total ($\%N_{TK}$); porcentaje de humedad ($\%H$); porcentaje de material orgánica ($\%MO$); porcentaje de carbono orgánico total ($\%COT$); temperatura (T); porcentaje de carbono inorgánico ($\%CI$). Los parámetros resultantes del análisis BEST está marcado con un asterisco (*).....124

Figura 4.22. Fotografías de las diversas morfologías de partículas virales mediante TEM en el lodo de la Pila II (la línea de la escala corresponde a 200 nm).....125

Figura 4.23. Fotografías de las diversas morfologías de partículas virales mediante TEM a los 14 días del proceso de compostaje de la Pila II (la línea de la escala corresponde a 200 nm).....126

- Figura 4.24. Fotografías de las diversas morfologías de partículas virales mediante TEM a los 70 días del proceso de compostaje de la Pila II (la línea de la escala corresponde a 200 nm).....127
- Figura 4.25. Porcentaje de abundancia relativa de la comunidad vírica en las muestra del lodo, tiempo 14 y tiempo 70, de la Pila II mediante secuenciación masiva con Ion Torrent.....128
- Figura 4.26. Árbol de asignación taxonómica de la comunidad vírica en la muestra del lodo de la Pila II obtenida mediante Ion Torrent.....131
- Figura 4.27.Árbol de asignación taxonómica de la comunidad vírica en la muestra correspondiente a los 14 días de la Pila II obtenida mediante Ion Torrent.....133
- Figura 4.28. Árbol de asignación taxonómica de la comunidad vírica en la muestra correspondiente a los 70 días de la Pila II obtenida mediante Ion Torrent.....134
- Figura 4.29. Frecuencia de enzimas extracelulares producidas por las cepas bacterianas aisladas del proceso de compostaje de la Pila II: Distribución taxonómica de las bacterias aisladas e identificadas a nivel de orden (a) y distribución de las enzimas producidas por las cepas bacterianas aisladas. Los números indican el número de cepas bacterianas productoras de la enzima correspondiente (b).....136
- Figura 4.30. Cuantificación del efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa en distintas cepas bacterianas: *Bacillus pumilus* BM02 (a), *Bacillus pumilus* BM05 (b), *Bacillus pumilus* BMT02 (c), *Bacillus stratosphericus* BM20 (d), *Bacillus stratosphericus* BT09 (e), *Bacillus stratosphericus* BM43 (f), *Bacillus safensis* BM34 (g), *Pseudomonas formosensis* BT87 (h), *Pseudomonas formosensis* BT88 (i), *Serpens flexibilis* BT70 (j) Los resultados se muestran en función de la producción de unidades de enzima por unidades formadores de colonias (U UFC⁻¹). Las barras de error representan la desviación estándar obtenido a partir de tres réplicas independientes (n=3).....145
- Figura 4.31. Frecuencia de enzimas extracelulares producidas por las cepas fúngicas aisladas del proceso de compostaje de la Pilla II. Distribución taxonómica de los

hongos aislados e identificados a nivel de orden (a) y distribución de las enzimas producidas por las cepas fúngicas aisladas. Los números indican el número de cepas bacterianas productoras de la enzima correspondiente (b).....148

