



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**ESTUDIO DE LOS PROCESOS MICROBIANOS
IMPLICADOS EN LA UTILIZACIÓN DE
Lodos URBANOS DE DEPURADORAS PARA
LA PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES
LÍQUIDOS (TÉ DE COMPOST)**

Tesis Doctoral

MARÍA VELA CANO

Granada, noviembre de 2014

TESIS DOCTORAL

Estudio de los procesos microbianos implicados en la utilización de lodos urbanos de depuradora para la producción de biofertilizantes líquidos (té de compost)

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada por la Licenciada en Ciencias Ambientales María Vela Cano

Fdo.: Dña. María Vela Cano

Directores

Dña. M^a Victoria Martínez Toledo

Catedrática de Universidad

Dpto. Microbiología

Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

D. Gabriel Delgado Calvo-Flores

Profesor Titular de Universidad

Dpto. Edafología y Química Agrícola

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

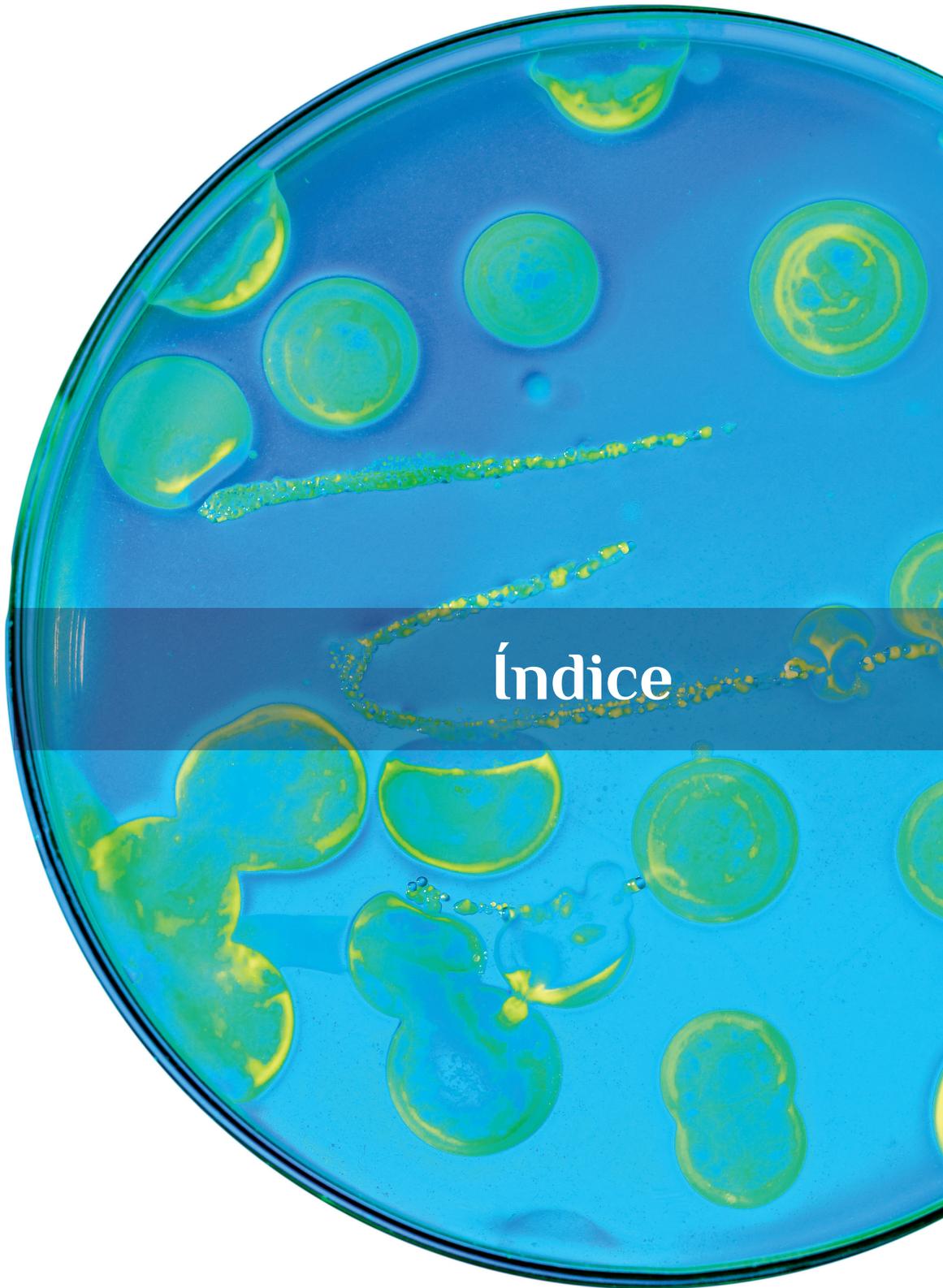
El presente trabajo para la obtención del grado de Doctor ha sido realizado en el Instituto Universitario de Investigación del Agua, en el departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, en el departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia y en el Institut für Mikrobiologie de la Universidad de Innsbruck. La temática y objetivos tratados en este trabajo se enclavan dentro del Proyecto Interdisciplinar de Investigación: "Utilización de lodos de depuradoras para la producción de biofertilizantes (téde compost). Valoración del biorresiduo (P09-RNM-5203)" concedido por la Junta de Andalucía al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, al Instituto Universitario de Investigación del Agua y al Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Farmacia, todos ellos pertenecientes a la Universidad de Granada. Dña. María Vela Cano, Licenciada en Ciencias Ambientales, disfrutó de una beca de Formación de Personal Investigador en Formación correspondiente a los Proyectos de Investigación de Excelencia, concedida por la Junta de Andalucía.

Recordando un viejo aforismo, que reza:

Dímelo y lo olvidaré,

Muéstramelo y lo recordaré

Déjame hacerlo y lo comprenderé



Índice

RESUMEN	1
EXTENDED ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	45
1. Residuos	47
1.1. Residuos sólidos	48
1.2. Residuos líquidos.....	50
1.3. Gestión de Residuos	51
1.3.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) ..	53
1.4. Lodos de depuradora	56
1.4.1. Mecanismos de gestión de los lodos	58
1.5. Compost y Té de compost	62
1.5.1. Fases en la elaboración de compost.....	63
1.5.2. Factores que afectan al proceso de compostaje.....	65
1.5.3. Sistemas de compostaje	68
1.5.4. Beneficios del compost	71
1.6. Té de compost	72
1.6.1. Métodos de elaboración del té de compost.....	73
1.6.2. Aplicación del té de compost	75
1.6.4. Limitaciones en el uso ambiental del té de compost	77
1.6.5. Problemática ambiental asociada a la presencia de metales pesados en el té de compost de lodo de depuradora ..	78

2. Suelos.....	84
2. 1. Agricultura y suelos de olivar.....	89
2.2. Enmiendas del suelo	92
2.3. Uso de microcosmos edáficos para la determinación del efecto de enmiendas	93
3. Estudio de las comunidades microbianas en el té de compost y en los suelos.....	96
3.2. Actividades enzimáticas	97
3.3. Estudio del ADN.....	98
OBJETIVOS	103
MATERIAL Y MÉTODOS.....	109
1. ELABORACIÓN DEL TÉ DE COMPOST: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA DEL MISMO.	112
1.1. Descripción de la planta piloto	112
1.2. Compost utilizado	113
1.3. Condiciones de elaboración del té de compost.....	115
1.4. Determinaciones analíticas.....	115
1.4.1. Parámetros físico-químicos.....	115
1.4.2. Parámetros biológicos	116
1.4.2. Concentración de metales pesados asimilables.....	118
2. Ensayos de biorremediación de metales pesados.....	118
2.1. Selección y aislamiento de microorganismos cultivables presentes en el té de compost.....	118
2.2. Preparación de inóculos.....	118
2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (cmi)	119
2.4. Análisis filogenético de microorganismos resistentes a metales pesados.....	123

2.4.1. Extracción de adn.....	123
2.4.2. Amplificación por pcr del gen codificante del ARNR 16S.....	125
2.4.3. Secuenciación.....	126
2.4.4. Análisis informático de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos	126
2.5. Experimentos de eliminación.....	127
2.5.1. Cultivos en batch.....	127
2.5.2. Estudio por icp-masas	127
2.5.3. Microscopía electrónica de transmisión	128
3. Experimentos con microcosmos.....	129
3.1. Suelo empleado.....	129
3.2. Montaje de microcosmos y establecimiento de las condiciones de trabajo.....	130
3.3. Determinaciones analíticas.....	132
3.3.1. Parámetros físico-químicos.....	132
3.3.2. Parámetros biológicos	134
3.3.3. Análisis de biodiversidad	138
3.3.4. Concentración de metales pesados asimilables.....	143
3.4. Análisis estadístico	144
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	147
1. Elaboración del té de compost y sus propiedades físicoquímicas y microbiológicas.....	149
1.1. Optimización del proceso de elaboración.....	149
1.2. Caracterización físico-química y microbiológica del té de compost.....	153
2. Resistencia de los microorganismos presentes en el té de compost a distintos metales pesados	156
2.1. Análisis y selección de microorganismos cultivables del té de compost	156

- 2.2. Determinación de los valores de Concentración Mínima Inhibitoria para cada una de las 30 cepas aisladas del té de compost..... 158
- 2.4. Estudios de eliminación de Cu, Cd, Pb y Zn por parte de Rhodococcus sp.166

3. Valoración del potencial fertilizante del té de compost mediante ensayos con microcosmos edáficos.....170

- 3.1. Cantidades y distribución temporal de las adiciones de té de compost..... 170
- 3.2. Evolución de los microcosmos edáficos ensayados..... 173
 - 3.2.1. Datos estadísticos descriptivos 173
 - 3.2.2. Relación entre las variables de ensayo y del sistema edáfico..... 176
 - 3.2.3. Estudio de la variabilidad de los sistemas edáficos ensayados mediante análisis factorial..... 178
 - 3.2.4. Estudio de la influencia de las variables de ensayo mediante análisis de la varianza..... 186
 - 3.2.5. Evolución temporal de las variables del sistema edáfico..... 191
 - 3.2.6. Estudio de las variables más representativas de los microcosmos edáficos, mediante análisis discriminante.....217
 - 3.2.6. Relaciones entre las variables de los microcosmos edáficos, según las distintas condiciones experimentales.....221
- 3.4. Análisis de la biodiversidad microbiana en los microsistemas edáficos ensayados231
- 3.5. Otras enmiendas240
- 3.6. Anexo de tablas242

CONCLUSIONES251

BIBLIOGRAFÍA257



Resumen

El hombre desde los inicios de su historia, ha hecho uso de los bienes, tanto materiales como energéticos, que ofrece la naturaleza; generando a continuación y de manera inevitable unos productos de desecho o residuos. Aunque los primeros hombres vivieron en relativa armonía con el medio ambiente, el desarrollo industrial y tecnológico que ha acontecido en los últimos tiempos ha provocado un deterioro ambiental sin precedentes.

Un *residuo sólido* se hace referencia a cualquier objeto o material de desecho que se produce tras la fabricación, transformación o utilización de bienes de consumo y que se abandona después de ser utilizado mientras que los residuos líquidos se definen como la combinación de agua y residuos procedentes de residencias, instituciones públicas y establecimientos industriales, agropecuarios y comerciales, a los que pueden agregarse de forma eventual determinados volúmenes de aguas subterráneas, superficiales y pluviales.

Referente a esta cuestión, cabe destacar la importancia que un correcto manejo de los residuos en general y de las aguas residuales en particular puede tener, ya que un tratamiento negligente de las aguas residuales podría acarrear muy graves consecuencias para la salud humana, el medio ambiente y el desarrollo económico. Debido a la creciente preocupación por una correcta preservación del medio ambiente y a la legislación surgida al respecto se crearon las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales o (EDARs), instalaciones donde el agua residual se somete a un proceso en el que, por combinación de diversos tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, se consigue eliminar en primer

lugar las materias en suspensión, las sustancias coloidales y, finalmente, las sustancias disueltas.

Resultado de la depuración de las aguas residuales se generan unos subproductos sólidos ricos en materia orgánica y otros nutrientes llamados lodos de depuradora.

Existen diferentes vías de gestionar los lodos procedentes de las EDARs, pero es importante en cualquier caso tener en cuenta su composición, que dependerá directamente de las características de las aguas residuales de las que se originan. Entre los posibles usos que se le pueden dar a los lodos se encuentra el compostaje de los mismos.

El compostaje es una técnica respetuosa con el medio ambiente cuyo producto final, se caracteriza por ser estable y libre de patógenos a la vez que rico en nutrientes. Esto se debe a la sucesión de poblaciones microbianas que aparecen según varía la temperatura de la pila de compost y a los procesos de oxidación-reducción que llevan a cabo, que se repiten hasta que quedan los compuestos más estables.

Numerosos autores y diversos estudios describen los beneficios que sobre el suelo tiene la aplicación de compost. Se ha demostrado que la aplicación de compost a los suelos mejora las propiedades físicas de los mismos, influyendo positivamente sobre la estructura de todos los tipos de suelos así como en la porosidad, la capilaridad del agua a través del suelo y el crecimiento de las raíces. Además, incrementa la formación de humus y protege el suelo de la erosión, la sequía, la contaminación y de otras condiciones extremas.

A nivel biológico la adición de compost estimula la diversidad y actividad microbiana en el suelo reduciendo la de otros patógenos como los nematodos.

También se ha visto que favorece las propiedades químicas, aumentando el contenido en macronutrientes y micronutrientes, la capacidad de intercambio catiónico.

En los últimos tiempos, se ha intentado mejorar el uso agrícola del compost a través de un derivado líquido del mismo denominado “té de compost” el cual presenta aspectos muy significativos.

El té de compost es un extracto acuoso del compost de alta actividad biológica. Se utiliza como fertilizante, debido a que contiene nutrientes solubles y microorganismos beneficiosos. Algunos de los beneficios que ofrece su uso, es el control de patógenos y la promoción del crecimiento vegetal.

Un amplio número de factores, entre los cuales se encuentra el tipo de proceso de elaboración del compost, influyen en los componentes químicos y microbiológicos del té de compost. Así, un compost de calidad, permitirá fabricar un té de compost con alta calidad, si es elaborado con la metodología correcta. Por esta razón, las técnicas de producción de té de compost, que se dividen en están basadas en la regulación de ciertos parámetros para generar condiciones más favorables para la presencia y desarrollo de organismos beneficiosos en el producto final.

Hay dos métodos fundamentales de producción de té de compost, el que requiere aireación (ACT) y el que no la requiere (NCT). Independientemente de la aireación, en ambos métodos existe una fermentación intencionada del compost en agua durante un tiempo determinado, entendiendo por fermentación al cultivo de microorganismos. Ambos métodos de producción de té de compost requieren de un recipiente de fermentación, compost, agua.

El té de compost, contiene un set de microorganismos aeróbicos que realizan una serie de funciones beneficiosas para el desarrollo de las plantas como consumir exudados de las plantas, ocupar los sitios de infección o producir componentes que inhiben la actividad y crecimientos de microorganismos fitopatógenos.

Por otro lado, se ha observado que el té de compost proporciona múltiples beneficios cuando se aplica en forma de fertilizante ya que mejora la nutrición de las plantas y de los microorganismos beneficiosos debido

a que los nutrientes solubles en el té permiten que los microorganismos crezcan más rápido además de que los nutrientes solubles del té nutren a las plantas, haciéndolas más saludables y capaces de generar más exudados asimilables.

No obstante existen algunos posibles aspectos negativos derivados del uso de compost inmaduro para elaborar té de compost, lo que puede afectar al crecimiento y provocar daños en los cultivos. Es necesario tener en cuenta además, la composición del compost a partir del cual se obtiene el té de compost, puesto que puede contener metales pesados.

El contenido en metales pesado juega un papel importante en la calificación de un compost y por consiguiente en el té de compost. Desde el punto de vista ambiental, es el factor más limitante y el más necesario de controlar. El compost de lodos de depuradora puede presentar contenido apreciable en metales pesados consecuencia de la actividad humana e industrial, ocasionando restricciones en la calidad final del producto.

Los metales pesados pueden representar un serio problema medioambiental debido a la alta peligrosidad al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años, contaminando el suelo y acumulándose en las plantas y los tejidos orgánicos generando biomagnificación en los seres vivos como consecuencia de su entrada en la cadena trófica.

El suelo es un sistema dinámico, complejo, abierto, vivo y frágil que constituye uno de los factores más importantes en el equilibrio global de la biosfera por lo que debe ser protegido para garantizar su estabilidad, es un sistema complejo que tiene la capacidad de desarrollar diversas funciones.

No obstante a pesar de ser un elemento esencial para el buen funcionamiento de cualquier ecosistema está sometido a diversos peligros. El riesgo de daño al suelo surge tanto de factores de origen natural como antropogénico que pueden causar su degradación.

En la zona mediterránea las malas prácticas agrícolas son una de las principales causas de degradación del suelo. Uno de los ejemplos más claros e importantes de cultivo extensivo tradicional en Andalucía es el cultivo del olivo, que se desarrolló en las zonas marginales.

Hace años, el sistema de cultivo del olivo era sostenible con el medio ambiente, había pocos olivos con una productividad también baja. Sin embargo, hoy en día, el cultivo del olivo se ha convertido en intensivo, lo que ha provocado una pérdida de la biodiversidad. Este hecho, combinado con la mala calidad que el suelo de olivar tradicionalmente ha tenido, resulta en un grave problema de degradación del suelo. A esto hay que sumarle la erosión a la que está sometido el suelo de olivar con la consiguiente pérdida de la fertilidad, que afecta al contenido de carbono orgánico, entre otros nutrientes, provocado también por las empinadas pendientes del terreno, el clima mediterráneo, que normalmente tiene largos períodos de sequía seguidos de tormentas torrenciales, y la falta de cobertura del suelo.

Las enmiendas orgánicas, de especial importancia en este proyecto, son residuos de origen animal y vegetal que adicionados a los suelos mejoran sus características químicas, físicas y biológicas.

Uno de los sistemas que se ha usado y se sigue usando hoy para estudiar diversos parámetros edáficos bajo condiciones de laboratorio es el de los microcosmos, ya que ofrece un modelo simplificado de un ecosistema.

Cuando un microcosmos está diseñado para representar un modelo de un sistema que ya existe, debe contener todos los rasgos característicos de dicho ecosistema. Por lo general se recomienda que los componentes utilizados en el microcosmos se obtengan de los ecosistemas naturales.

Para una mejor comprensión del efecto que la adición del té de compost o el compost provocan sobre un suelo al que se le añade alguno de estos productos como biofertilizantes, es necesario conocer las comunidades microbianas presentes. Así pues es interesante describir los métodos analíticos para evaluar la diversidad microbiana.

Tradicionalmente, el estudio de las comunidades microbianas de una muestra ambiental se ha determinado usando la técnica de **recuento en placa**. Para ello se usan diferentes medios de cultivo cuya composición nutricional varía obteniéndose así distintos grupos microbianos.

Otro de los métodos para la estimación de los microorganismos contenidos en una muestra puede llevarse a cabo a través del estudio de las funciones que éstos realizan. Para realizar una aproximación al entendimiento de los ciclos de los nutrientes y a los niveles de actividad microbiana responsables de los procesos que tienen lugar en los suelos, se investigan varias **actividades enzimáticas**, ya que dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este heterogéneo y complejo sistema.

Finalmente, los estudios de ADN constituyen otra de las técnicas para el estudio de las poblaciones microbianas. Destacan en este punto los procesos de DGGE y TGGE (análisis cualitativo) y qPCR (análisis cuantitativo).

En este punto y de acuerdo a todo lo expuesto con la realización de este proyecto se pretende:

1. Elaborar un té de compost a partir de lodos de depuradora y establecer un protocolo del buen uso de este biofertilizante sobre suelos agrícolas para mejorar sus propiedades y aumentar su fertilidad. Se proyecta también encontrar y proponer las cantidades óptimas de dosificación de su aplicación.

Para ello se han desarrollado una serie de **objetivos parciales** que se detallan a continuación:

1. Optimizar del proceso de elaboración del té de compost, mediante análisis de la evolución en el tiempo y la adición de sustratos ricos en carbono.

2. Estudiar las distintas poblaciones microbianas presentes en el té de compost y su capacidad para tolerar y retirar y/o inmovilizar determinados metales pesados presentes en el té de compost.

3. Determinar el efecto de la aplicación del té de compost, en cuanto a dosis, patrón de aplicación, tiempo y temperatura de incubación, sobre la evolución de las propiedades de un suelo agrícola de olivar, mediante experimentos en microcosmos edáficos. Este objetivo se desarrolla en tres aspectos:

Para la consecución de dichos objetivos, el trabajo de investigación que se llevó a cabo en tres fases. Una primera fase que pretendía establecer cuáles eran las condiciones óptimas para la elaboración del té de compost. La segunda fase se centró en averiguar si alguna o algunas de las poblaciones microbianas contenidas en el té de compost tenían la capacidad de tolerar la presencia de metales pesados, y en caso afirmativo identificarla y evaluar su potencial en biorremediación. Y la tercera fase tiene como propósito testar la capacidad del té de compost como biofertilizante. Para ello se realizaron experimentos con microcosmos que contenían suelo de olivar y que se regaron con distintas cantidades de té de compost.

Para la elaboración del té de compost se usó una planta a escala piloto que constaba de un biorreactor en el que se introdujeron 100 L de agua destilada y un recipiente cilíndrico semipermeable que contenía 1,5 kg de compost de lodos de depuradora de agua residual urbana.

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de fabricación se elaboró un primer té de compost mezclando únicamente agua destilada y té de compost dejando macerar la muestra durante 7 días. Finalizado este primer experimento, se repitió el proceso añadiendo, al inicio 100 mL de melaza como fuente extra de carbono. En ambas experiencias se midieron el pH, la temperatura y la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos del té de compost.

Una vez establecidos los parámetros más adecuados se produjo un nuevo té de compost al que se le hizo un análisis físico-químico y microbiológico más detallado así como la detección y cuantificación de metales pesados asimilables presentes.

Motivado por la problemática ambiental asociada la presencia de metales pesados, se llevó a cabo la segunda de las fases de trabajo previstas. Para ello, se seleccionaron, atendiendo a criterios morfológicos, 30 cepas bacterianas que se sembraron a continuación en placas con medio LPM sólido adicionado con distintas cantidades de Cu, Zn, Cd y Pb. Las concentraciones testadas para cada metal fueron 0,25–16 mM para el Cu y Zn, 0,125–16 mM en el caso del Pb y 0,015–4 mM para el Cd. Tras un mes de incubación se comprobó si había o no había crecimiento por parte de cada una de las cepas y se establecieron así las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) para cada cepa y cada metal. A raíz de los resultados se seleccionaron las cepas que más resistencia mostraron y se identificaron taxonómicamente por amplificación parcial y posterior secuenciación del gen codificante del ARNr 16S.

Una de las cepas, la cepa número 3, mostró una tolerancia excepcional para todos y cada uno de los metales lo que originó un estudio más detallado de dicha cepa y probar así su capacidad para eliminar el Cu, Zn, Cd y Pb del medio. Se realizaron para ello estudios de eliminación mediante cultivos en batch. Así, se inocularon con 1 mL de una suspensión de células de la cepa 3 (crecida en medio TSB durante 24h a 28 °C), matraces erlenmeyer que contenían 50 mL de medio LPM líquido modificado con una concentración de 4 mM de Cd y de 8 mM de Zn, Cu y Pb. Tras 24h de incubación a 28 °C y 100 rpm se determinó por IPC-MS la concentración de cada metal pesado en los matraces. Al mismo tiempo, una muestra de cada cultivo se sometió a un estudio mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para observar los mecanismos de adsorción de las células.

Finalmente, se realizaron estudios con microcosmos edáficos para testar la capacidad del té de compost como biofertilizante.

Los microcosmos consistían en recipientes troncocónicos de plástico inerte (PVC) y opaco. Una vez lavados con agua destilada y alcohol, se colocó sobre el fondo un filtro de fibra de vidrio cubierto por una capa de 230 g de suelo de olivar, previamente tamizado y seleccionado de fracción inferior a 2 mm

Una vez elaborados los microcosmos edáficos, éstos se mantuvieron a distintas temperaturas: 21°C (temperatura ambiente) y 35°C.

Se diseñaron 4 series de tratamientos que utilizaban agua y/o té de compost en las irrigaciones:

- * **Tratamiento A (control):** irrigaciones únicamente con agua destilada.
- * **Tratamiento B:** primera irrigación con té de compost y el resto con agua destilada.
- * **Tratamiento C:** irrigaciones únicamente con té de compost.
- * **Tratamiento D:** primera irrigación con té de compost, posteriormente agua destilada, día 15 otra vez té de compost, a continuación agua, día 45 té de compost de nuevo y finalmente agua destilada.

La experimentación se extendió en un tiempo total de 90 días a lo largo de los cuales se hicieron 7 muestreos (4, 8, 15, 30, 45, 60 y 90 días) obteniéndose por lo tanto un total de 56 microcosmos (2 temperaturas x 4 tratamientos x 7 muestreos).

Sobre cada uno de los microcosmos se realizaron diversas determinaciones analíticas:

Químicas y físico-químicas: medida de pH, medida de la conductividad eléctrica, % de CaCO₃, carbono orgánico (C.O.), determinación del nitrógeno total, determinación del fósforo asimilable y determinación del potasio asimilable.

Microbiológicas: recuento de microorganismos aerobios mesófilos y determinación de las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y básica y arilsulfatasa.

Contenido en metales pesados asimilables

Se llevó a cabo a continuación, un estudio de biodiversidad en el que se estudiaron algunos de los grupos microbianos de interés que se pueden encontrar en los suelos agrícolas. Estos grupos fueron: bacterias totales, bacterias oxidadoras de amonio (AOB), arqueas oxidadoras de amonio (AOA) y bacterias ALP-harboring.

Debido al elevado número de microcosmos se eligieron los correspondientes a los tiempos 4, 8, 30 y 90 días ya que eran donde ocurrían los cambios más significativos.

Así pues, el primer paso fue la extracción del ADN bacteriano total de los microcosmos elegidos, usando el kit FastDNA para suelo siguiendo los pasos de acuerdo con el protocolo del fabricante. El paso siguiente a la extracción de ADN fue la amplificación de los genes correspondientes a los grupos de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Seguidamente, se procedió a la separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización o DGGE. Se llevó a cabo mediante la carga de 60 ng de producto de PCR en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalización específica para cada grupo microbiano. Una vez los geles estuvieron teñidos y secos se escanearon y la imagen se trató digitalmente.

Para finalizar, se realizó un análisis de PCR cuantitativa o PCR en

tiempo real, de los grupos bacterias totales, AOA y AOB, que es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable. A dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real.

Los resultados del estudio revelan que la adición de melaza al té de compost tiene un efecto positivo sobre el número de UFC mL⁻¹ ya el incremento que se produce en este valor es superior al que ocurre en el caso de la no adición de melaza. No obstante, durante las primeras 48 horas del proceso de maceración, el pH del té de compost sufre cambios significativos consecuencia de la producción de ácidos derivados de la actividad microbiana sobre la melaza (compuesto muy rico en azúcares). El mismo comportamiento obtienen Shrestha et al. (2011), cuando utilizan melaza como suplemento en el té de compost partiendo de un compost hecho a partir del contenido del rumen.

Así, y teniendo en cuenta estos datos, se determinó que el té de compost elaborado sin melaza mantiene mucho más estable el sistema, situándolo en unos niveles de pH más próximos a la neutralidad y evitando posibles efectos indeseables difíciles de controlar, lo que hizo que se decidiera elaborar el té de compost sin la adición de melaza y durante 5 días.

Bajo estas condiciones, se produjo un té de compost cuyo pH final fue de 8,4, que tenía un contenido en N y P de 0,006%, y de 0,024 de K y cuya cantidad de bacterias aerobias mesófilas se situó en 5,3 10⁶ UFC mL⁻¹.

De dicho té de compost se aislaron 30 cepas bacterianas que posteriormente se cultivaron en un medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de Cu, Pb, Cd y Zn.

En una apreciación a nivel general, se observó que la tolerancia de las cepas probadas está en orden de $Cu > Pb > Zn > Cd$. Resultados similares a los conseguidos por Çolak et al. quienes testó la resistencia las cepas *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus* a diversas concentraciones de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} , concluyendo finalmente que dichas cepas son altamente resistentes al cobre y al plomo.

Más concretamente, sobre el 50% de las cepas presentaron crecimiento a una concentración máxima de 4mM de Cu mientras que el resto, presentaron crecimiento en una concentración máxima de 8mM. Pero en ninguna de las 30 cepas ensayadas se observa crecimiento por encima de dicha concentración. Por su parte, el Pb se comporta de forma muy similar al cobre y aproximadamente el 50% de las cepas aisladas toleran concentraciones comprendidas en el rango 8 – 16 mM. En el caso del Zinc se observa que sólo la cepa 3, presenta el máximo de crecimiento a una concentración de 8 mM mientras que la mayoría de cepas restantes presentan crecimiento hasta una concentración máxima de 4mM. Finalmente, cabe destacar que el cadmio fue el metal que presentó mayor toxicidad. En este sentido, se observa como la mayoría de las cepas fueron incapaces de crecer a concentraciones de Cd superiores a 4 mM.

A partir de los datos de CMI de cada cepa se determinó que 8 de las 30 cepas ensayadas, identificadas como *Rhodococcus sp.*, *Virgibacillus sp.*, *Leifsonia shinshuensis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus sp.*, *Achromobacter sp.* y *Oceanobacillus sp.*, fueron las más resistentes a la presencia de Pb, Cd, Cu y Zn. Asimismo, la cepa identificada como *Rhodococcus sp.*, destacó como la cepa más resistente ya que mostró crecimiento en las máximas concentraciones ensayadas de todos los metales pesados.

Además de la resistencia a la presencia de metales pesados en el medio, la cepa *Rhodococcus* sp. fue capaz de eliminar y acumular, tanto en la superficie celular como intracelularmente, Cu, Zn, Cd y Pb, lo que sugiere la bioacumulación activa de estos metales pesados, haciendo que pueda ser aprovechada en los procesos de biorremediación, biosorción y bioacumulación.

En lo referente a los experimentos llevados a cabo en microcosmos se hizo necesario un amplio estudio estadístico, debido a la gran cantidad de variables dependientes e independientes que se manejaban.

Así pues, los datos obtenidos la estadística descriptiva muestran unos coeficientes de variación entre 1% y 113%, lo que refleja la coexistencia de variables con una escasa desviación respecto a su valor medio, mientras que otras tienen una extrema variabilidad. .

Por su parte, los coeficientes de correlación destacan, además de las relaciones obvias entre días y cantidad de riego, la relación existente entre los días y la fosfatasa básica ($r= 0,71$), entre el aumento de CE y la cantidad de riego total ($r= 0,63$) y la relación inversa entre arisulfatasa y temperatura ($r= -0,63$).

Se han probado además, modelos de regresión lineal múltiple para cada variable. Los más significativos fueron los referentes a la CE, UFC, actividades fosfatasa básica y arilsulfatasa y los metales pesados Mn y Sc.

Con objeto de clarificar las relaciones y buscar la combinación de variables que mejor explica la variabilidad de nuestros datos, se ha realizado un análisis factorial. La resolución establece 9 factores con eigenvalue mayor de 1 que explican el 81,1% de la variabilidad de los datos, teniendo el resto una escasa influencia en el sistema.

Tanto el factor 1 como el 2, respectivamente con un porcentaje de varianza explicada del 24,4 y 17,7, y podrían etiquetarse como “días de incubación”. El factor 3 es claramente un factor “temperatura”. El factor 4 podría representar al “riego”, con la relación inversa entre mL de agua

(-0,795) y mL de té (0,607) adicionados. El factor 5, que explica el 6,7% de varianza e incluye a las variables pHagua (0,652) y pHClK (0,843), podría denominarse factor “reacción del suelo”. El factor 6 podría denominarse factor “carbono orgánico”. Los factores 7 (4,4% de varianza) y 8 (3,2% de varianza), recogen a “metales” (Sn, In) con escasa carga en los factores anteriores. Finalmente, el factor 9, agrupa a las variables “carbonatos y N”, que muestran una relación inversa.

El análisis de varianza multifactorial se usó para determinar los factores e interacciones que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las variables de suelo estudiadas. Las clases de tratamiento analizadas son las explicadas anteriormente (A, B, C y D), las clases días son los tiempos de muestreo y la clase temperatura corresponden a las dos temperaturas de incubación. Las dos fuentes de variación más importantes en los datos resultaron ser tratamiento y días.

La evolución temporal de las variables fue:

- * **pH:** valores son muy similares en los 4 tratamientos y relativamente homogéneos a lo largo del tiempo, aunque se observa un incremento leve en los primeros 15 días.
- * **Conductividad eléctrica:** en términos generales los valores muestran una tendencia al aumento dentro de la normalidad.
- * **Carbonato cálcico equivalente:** la evolución es paralela y muestra un comportamiento muy parecido al del pH coincidiendo con los valores más bajos con los valores más bajos de pH.
- * **Carbono orgánico:** las variaciones que se observan no son destacables.
- * **Macronutrientes NPK:** En los tratamientos que reciben más té de compost, se aprecia una tendencia al aumento en los valores medios de P, una disminución en el caso del K y un contenido sostenido de N.

- * **Recuento de microorganismos aerobios mesófilos:** se observa un aumento en la cantidad de microorganismos del suelo a los 4 días y un contenido más bajo en el resto de días, comportamiento dentro de la normalidad que pasa de un importante déficit de agua a un grado de humedad óptimo.
- * **Actividad fosfatasa ácida:** La aplicación del té de compost supuso un incremento de las actividades con respecto al valor de la muestra inicial en todos los tratamientos aunque las diferencias significativas medias por tratamientos se observan únicamente entre A y D.
- * **Actividad fosfatasa básica:** se aprecia un incremento significativo de la actividad fosfatasa básica al final del experimento, lo que indica un proceso de acumulación de esta exoenzima en los microcosmos.
- * **Actividad arilsufatasa:** el riego con té de compost (tratamientos B, C y D) ha favorecido la actividad de esta enzima en el suelo.
- * **Mn asimilable:** se observa una tendencia general a la disminución de Mn asimilable a lo largo del tiempo.
- * **V asimilable:** aunque con oscilaciones la cantidad de V asimilable en el suelo al final de la experiencia es superior a la cantidad inicial.
- * **Cu, Pb, Zn y Cd:** aunque en distintos grados, la tendencia general observada es a la disminución a lo largo del tiempo.

Al objeto de encontrar las variables que más se afectaron por las condiciones experimentales establecidas, se usó análisis discriminante. Primero se determinaron las variables significativamente predictoras, mediante un algoritmo de selección basado en stepwise regresión, y

después se ajustaron a ellas funciones discriminantes que maximizan las distancias entre los niveles o clases. La magnitud relativa de los coeficientes estandarizados en las respectivas ecuaciones sirve para determinar cómo las variables independientes están siendo usadas para discriminar entre clases.

Las siete variables discriminantes del proceso de cálculo se ajustaron significativamente a 3 funciones. De ellas, las dos primeras explican el 92% de la varianza entre niveles. La función 1 discrimina claramente el tratamiento A del resto. La función 2 ordena de mayor a menor a los tratamientos C, D, A, B. Por último, los dos grupos de temperatura se diferencian significativamente por ml de agua, ml de té, C.O., T1 y B1 agrupados en una única función.

La constatación de factores de variación en el total de los datos invita a analizar las relaciones entre variables bajo condiciones más homogéneas. Separando los datos por tratamiento y temperatura, se observa un aumento en el valor y número de los coeficientes de correlación respecto al análisis de la población.

El aumento de la significación estadística para la relación entre variables cuando se analizan atendiendo al tipo de tratamiento, es un hecho interesante que puede interpretarse de dos maneras. En primer lugar señala la importante influencia que tiene el modelo de riego con té de compost sobre las respuestas de los microcosmos edáfico, teniendo incluso más peso la distribución del riego que la cantidad de té añadida tal y como comentamos anteriormente, y en segundo lugar valida el experimento planteado en el que se ha ensayado tres modalidades de riego.

Para completar el estudio y al igual que se hizo para el total de datos, se probaron modelos de regresión lineal para cada una de las variables fisicoquímicas y microbiológicas y para el Sc y Mn.

- * **Tratamiento A:** El sentido de las correlaciones en el tratamiento en blanco (A) a 21°C indica que, de modo natural, la humectación del suelo y el paso del tiempo suponen una bajada de pH, C.O. y UFC, mientras que aumenta CE, P, F. ácida y F. básica. La actividad arilsulfatasa también se favorece con la disminución de pH e incremento del contenido en P. Por su parte, las ecuaciones de regresión múltiple para el tratamiento A nos muestran que la CE el C.O., la fosfatasa básica y la arilsulfatasa se pueden predecir a partir los días del experimento, la temperatura de incubación y los mL de agua empleados en el riego.
- * **Tratamiento B:** Se aprecia que hay más índices de correlación a 21°C que a 35°C. De nuevo se observa que con el tiempo y riego disminuye C.O. y aumenta F. básica, pero ahora a 21° hay también una disminución de K. En lo que respecta a las ecuaciones de regresión múltiple, en este tratamiento las variables que mejor se pueden predecir, en función de las variables de ensayo, son el C.O., las actividades fosfatasa básica y arilsulfatasa y el Mn con un grado de significación bastante alto.
- * **Tratamiento C:** vuelve a aparecer la relación del tiempo y riego con CE, CO, fosfatasa básica y metales, pero cambia el sentido de la relación con el C.O. En este caso las ecuaciones de regresión muestran un valor predictivo para la CE, el CO, la actividad fosfatasa básica y los metales pesados Sc y Mn.
- * **Tratamiento D:** no hay relación de la humectación y tiempo con el C.O., pero sí con el K, la CE, la fosfatasa básica y los metales Sc y Mn.

En general, los resultados sugieren que la humectación, genera una disminución ligera del pH y aumento de la CE y de la actividad enzimática así como una degradación de materia orgánica. El C.O. no muestra un comportamiento regular en los distintos tratamientos puesto que disminuye con el tiempo en A y B, pero aumenta en C y pierde su relación en D. En lo que a macronutrientes se refiere cabe destacar que la disminución de K con el tiempo de humectación sólo es significativa en B y D mientras que el P aumenta en paralelo al contenido de fosfatasas. Por su parte, no hay correlaciones significativas del N con agua de riego, pero sí con el té que favorece el consumo de N. La relación agua y enzimas es más baja también que té y enzimas.

Con respecto a la parte microbiológica recalcar que el descenso en el número de microorganismos aerobios mesófilos presentes en el suelo sólo ocurre en el tratamiento A, pero no cuando se adiciona té y que la fosfatasa básica siempre aumenta con el tiempo de humectación, independientemente del tratamiento y temperatura.

Finalmente y centrándonos en los metales pesados destacar que la entrada de Sc y Mn en las tablas de correlación aparece cuando se adiciona té (tratamiento B, 21°C). Sus coeficientes se hacen más altos en C y D. El Sc se acumula en el tiempo mientras que Mn disminuye. Además, se observan pocas relaciones de los metales con el pH y cuando ocurre son discrepantes ($pH_{\text{agua}}\text{-Sc}$ en D-35 °C = -0,74; $pH_{\text{Cik}}\text{-Sc}$ en B-35 °C = 0,82), por lo que la disponibilidad de metales no parece ser dependiente del pH.

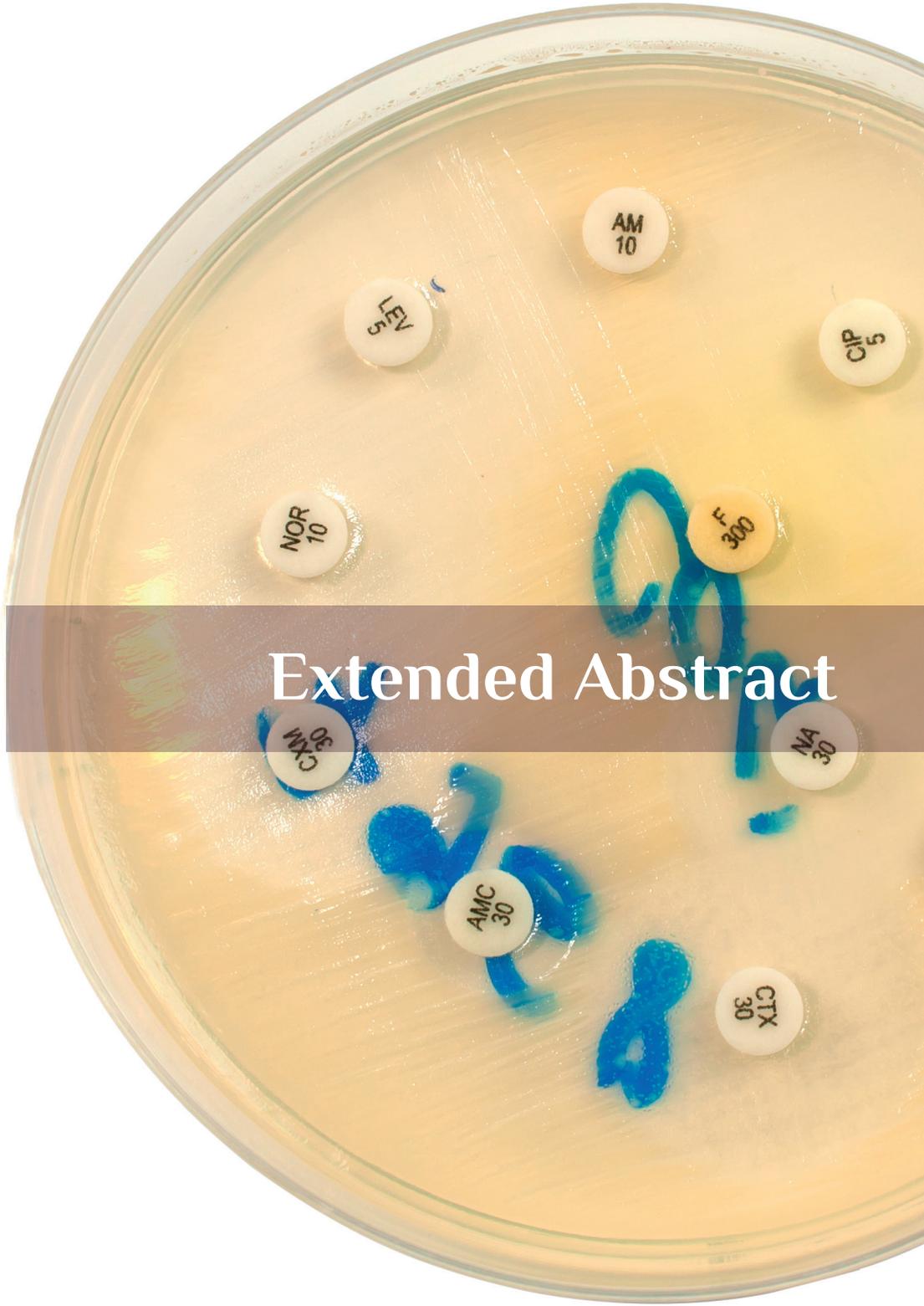
Así pues, y teniendo en cuenta todos estos datos se puede concluir que:

1. El tiempo óptimo del procesado del té de compost es de 5 días y la temperatura de unos 23 °C.
2. La adición de melaza a la concentración de 0,001% durante la producción del té de compost, genera la acidificación del lo que provoca alteraciones en la microbiota.

3. Las cepas bacterianas, aisladas e identificadas en el té de compost de lodos de depuradora como: *Rhodococcus* sp., *Virgibacillus* sp., *Leifsonia shinshuensis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus* sp., *Achromobacter* sp. y *Oceanobacillus* sp., se mostraron altamente resistentes a la presencia de altas concentraciones de Pb, Cd, Cu y Zn en nuestras condiciones de cultivo, destacando especialmente *Rhodococcus* sp.
4. Los estudios de microscopia electrónica han puesto de manifiesto que la cepa *Rhodococcus* sp. acumula Cu, Zn, Cd y Pb.
5. La adición de té de compost a un suelo agrícola de olivar, afecta significativamente al sistema edáfico, tanto en sus propiedades químicas y fisicoquímicas, incluyendo la biodisponibilidad de metales pesados, como en la actividad y diversidad microbiana del suelo.
6. Desde un punto de vista agronómico, y teniendo siempre como referencia los datos obtenidos del “tratamiento control”, las adiciones de té de compost al suelo incrementan el C.O. en las etapas iniciales y los macronutrientes NPK. Igualmente, se demuestra el efecto de las adiciones de té de compost en otras propiedades importantes del sistema edáfico. De esta manera, se aprecia un aumento, aunque moderado, de la C.E., incluso en las adiciones máximas.
7. La adición de té de compost al sistema edáfico, supone un aumento en el número de microorganismos aerobios mesófilos del suelo, aunque no es microbiológicamente significativo. Atendiendo a las actividades enzimáticas queda demostrado que la fosfatasa ácida se ve más afectada por la cantidad de té añadido, la fosfatasa por los días de incubación transcurridos y

la arilsulfatasa por la temperatura. Finalmente se observa como las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio son las más influidas por la cantidad y pauta de riego con té de compost.

8. La adición de té de compost al suelo supone un aumento en las cantidades de metales pesados asimilables, aunque no significativas. Este hecho provoca que los metales pesados no supongan un factor limitante para su aplicación como biofertilizante.



Extended Abstract

Since the beginning of its existence mankind has made use of the materials and energy offered by nature, inevitably this has led to the generation of waste or waste products. Although the first men lived in relative harmony with the environment, the industrial and technological developments that have happened in recent times have resulted in an unprecedented deterioration of the environment.

A **solid waste** refers to any object or waste material produced after the manufacturing, transformation or use of any consumer goods, which is abandoned after having been used; whereas **liquid wastes** are defined as the combination of water and waste from homes, public institutions and industrial, agricultural and commercial establishments, to which ground and surface water can be added to this list in certain volumes.

With regards to this issue, it should be noted that the importance of correctly managing waste in general and wastewater in particular may have, this is due to the fact that a negligent treatment of sewage can lead to very serious consequences for human health, the environment and for economic development. Due to the ever growing concern of looking after the environment, coupled with legislation that has recently emerged with this in mind, wastewater treatment plants (WWTPs) have been built, facilities where wastewater is subjected to a process by which combining various physical, chemical and/or biological treatments, manage to eliminate firstly, the suspension solids, colloidal substances, and finally, dissolved substances.

The result of the purification of wastewater generates some organic matter-rich solid by-products and other nutrients called **sewage sludge**.

There are different ways of managing the sludge from the WWTP, but it is also important to take into account its composition, which will directly depend on the characteristics of the wastewater which it originates from. Among the possible uses which can be given to this sludge is to compost it.

Composting is an environmentally friendly technique whose final product is characterised as stable and free of pathogens and at the same time rich with nutrients. This is due to the succession of microbial populations that appear according to the different temperatures that the compost pile reaches and in addition to the redox processes that occur, which are repeated until only the most stable compounds remain.

Numerous authors and several studies describe the benefits of the application of compost on soil. It has been shown that the application of compost to soil improves its physical properties, positively affecting the structure of all types of soils, as well as its porosity, the capillary action of water through the soil and root growth. In addition, it increases the formation of humus and protects the soil from erosion, drought, pollution and other extreme conditions.

At a biological level, the addition of compost encourages microbial diversity and activity in the soil and reduces the presence of other pathogens such as nematodes.

It has also been observed that it favours the chemical properties of soils, increasing the content on macronutrients and micronutrients and the cation exchange capacity.

Recently, attempts have been made to improve the agricultural use of compost through a liquid derived from the same, the so-called “compost tea” which can be beneficial for the environment and above all for agriculture.

Compost tea is a water extract from compost with a high biological activity. It is used as a fertiliser due to the fact that it contains soluble

nutrients and beneficial microorganisms. Some of the benefits offered by its use, are the control of pathogens and plant growth promotion.

A large number of factors, including the type of composting process, influence the chemical and microbiological components of the compost tea. Thus, good-quality compost, will allow one to manufacture a high quality compost tea, if it is prepared following the correct method. For this reason, the production techniques of compost tea are based on the regulation of certain parameters so as to create more favourable conditions for the presence and development of beneficial organisms in the final product.

There are two basic methods for producing compost tea, one which requires aeration (ACT) and the other which does not (NCT). Irrespective of whether there is aeration or not, in both methods there is a deliberate fermentation of the compost in water over a specific period of time, fermentation being understood as the cultivation of microorganisms. Both methods of producing compost tea require a fermentation container, compost and water.

Compost tea, contains a set of aerobic microorganisms that perform a series of functions that are beneficial to the development of plants, such as consuming the plant exudates, occupy sites of infection or produce components which inhibit the activity and growth of phytopathogenic microorganisms.

Furthermore, it has been observed that compost tea provides multiple benefits when applied in the form of a fertiliser as it improves the nutrition of plants and of the beneficial microorganisms. This is due to the fact that the soluble tea nutrients allow the microorganisms to grow faster in addition to the soluble nutrients in the tea nourishing the plants, making them healthier and capable of generating more assimilable exudates.

Nonetheless there are some possible negative aspects that arise from the use of immature compost to make compost tea, which can affect

growth and result in damage to the crops. It is also necessary to take into account the composition of compost from which the compost tea is obtained as it can contain heavy metals.

Heavy metal content plays an important role when assessing the quality of a compost and consequently of the compost tea. From the environmental point of view, it is the most limiting factor and the one that must be controlled the most. The compost of sewage sludge might have an appreciable content in heavy metals as a result of industrial and human activity, resulting in restrictions on the final quality of the product.

Heavy metals can represent a serious environmental problem because of the fact that they are not chemically or biologically degradable. Once released into the environment, they can remain for hundreds of years, polluting the soil and thus accumulating in plants and in organic tissue, which in turn generates biomagnification in living organisms as a result of their entry into the food chain.

Soil is a dynamic, complex, open system that is alive and very fragile. It constitutes one of the most important factors in the overall balance of the biosphere and as such must be protected to ensure its stability. Soil is a complex system that has the capacity to perform a multitude of functions.

However, despite being essential for any ecosystem to function well it is subjected to various risks. The risk of damage to soil comes not only naturally but also from anthropogenic factors that may give rise to its degradation.

In the Mediterranean area, poor agricultural practices are one of the main causes of soil degradation. One of the clearest examples comes from the most important extensive traditional farming in Andalusia, the cultivation of the olive tree, which was developed in marginal areas.

Years ago, the olive cultivation system was sustainable with the environment, there were few olive trees and productivity was also low.

However, nowadays, the cultivation of the olive tree has become intensive, which has led to a loss of biodiversity. This fact, combined with the traditionally poor quality of the soil of the olive groves has led to a serious problem of soil degradation. To this we must add the erosion to which the soil of the olive groves is subjected to and the consequent loss of fertility, which in turn affects the content of organic carbon, among other nutrients, also caused by the steep slopes of the terrain, the Mediterranean climate, which usually has long periods of drought followed by torrential storms, and the lack of ground cover.

Organic amendments, of particular importance in this project, are from animal and plant waste and that added to soil improves its chemical, physical and biological characteristics.

One of the systems which has been used and is still used today to study the various parameters of soil under laboratory conditions is that of microcosm, offering a simplified model of an ecosystem.

When a microcosm is designed to represent a model of a system that already exists, it should contain all of the characteristic features of the ecosystem. Usually it is recommended that the components used in the microcosm come from the natural ecosystems.

To better understand the effects of the addition of compost tea or compost on soil that have been added to any of these products as bio-fertilisers, it is necessary to know the microbial communities present. It is therefore of interest to describe the analytical methods for assessing microbial diversity.

Traditionally, the study of microbial communities in an environmental sample has been determined using the **plate counting technique**. To do this, different culture media, whose nutritional composition varies, thus targeting different microbial groups.

Another of the methods used to estimate the microorganisms in a sample can be performed through the study of the functions that they perform. To try and gain an understanding of nutrient cycles and levels

of microbial activity responsible for the processes that occur in soils, several **enzymatic activities** are investigated as they take account of biochemical reactions that occur within this heterogeneous and complex system.

Finally, DNA studies provide another technique to study microbial populations. The processes of DGGE, TGGE (qualitative analysis) and qPCR (quantitative analysis) stand out in this aspect.

At this point and according to all of the aforementioned, the aim of this project is to:

To prepare a compost tea from sewage sludge and establish a protocol for the proper use of this fertiliser on agricultural soils so as to improve their properties and increase their fertility. It is also projected to find and propose the optimal application dosage amounts.

For this purpose a series of **partial objectives** that are listed below have been developed:

1. To optimise the process of elaborating compost tea, by analyzing its evolution over time and with the addition of carbon-rich substrates.
2. To study the different microbial populations present in compost tea and their ability to tolerate and remove and/or immobilise certain heavy metals present in compost tea.
3. To determine the effect of the application of compost tea, in terms of dose, application pattern, incubation temperature and time on the evolution of the properties of an olive grove agricultural soil via experiments in soil microcosms. This goal is developed in three aspects:

To achieve these objectives, the research work that was carried out was done so in three phases. A first phase seeking to establish what were the optimal conditions for preparing compost tea. The second

phase focused on finding out if one or more of the microbial populations contained in compost tea had the ability to tolerate the presence of heavy metals, and if so, to identify and assess their potential in bioremediation. And the third phase intended to test the ability of compost tea as a biofertiliser. In order to do so, experiments were conducted with microcosms containing soil from an olive grove that were watered with different amounts of compost tea.

In order to elaborate the compost tea a pilot scale plant was used. This consisted of a bioreactor in which 100 L of distilled water were introduced and a semi-permeable cylindrical vessel containing 1.5 kg of compost sludge from an urban wastewater treatment plant.

In order to establish the optimum manufacturing conditions, a first compost tea was elaborated mixing only distilled water and compost tea leaving the sample to macerate for 7 days. After this first experiment, the process was repeated but by this time adding of 100 mL of molasses at the beginning as an extra source of carbon. The pH, temperature and the amount of mesophilic aerobic microorganisms in the compost tea were measured in both experiences.

Once the most appropriate parameters were established, a new compost tea was made to which more detailed physical-chemical and microbiological analyses were carried out on as well as detecting and quantifying the assimilable heavy metals present.

Motivated by environmental problems associated with the presence of heavy metals, the second of the planned phases was undertaken. To do so and according to morphological criteria, 30 strains of bacteria were selected and were then inoculated in plates with half solid LPM media with different amounts of Cu, Zn, Cd and Pb. The concentrations tested for each metal were 0,25-16 mM for the Cu and Zn, 0,125-16 mM in the case of Pb and 0,015-4 mM for the Cd. After having been incubated for a month signs for growth were checked for each of the strains and thus establishing the corresponding minimum inhibitory

concentrations (CMIs) for each strain and each metal. In accordance to the results, the strains that showed the highest resistance were selected and were taxonomically identified by partial amplification and the subsequent sequencing of the 16S rRNA coding gene.

One of the strains, strain number 3, showed an exceptional tolerance to all of the metals, and thus resulting in a more detailed study of the strain to test its ability to remove Cu, Zn, Cd and Pb from the media. In order to do so batch trials were carried out. Firstly, they were inoculated with 1 mL of cell suspension from strain 3 (grown in a medium of TSB during 24 h at 28 °C), erlenmeyer flasks containing 50 mL of medium liquid LPM modified with a concentration of 4 mM of Cd and 8 mM of Zn, Cu and Pb. After having been incubated for 24h at 28°C and at 100 rpm the concentration of each heavy metal in the flasks was determined by IPC-MS. At the same time, a sample of each culture was studied using electron transmission microscopy (TEM) to observe the adsorption mechanisms of the cells.

Finally, soil microcosm studies were conducted so as to test the ability of compost tea to act as a biofertiliser.

The microcosms consisted of inert opaque plastic (PVC) tapered containers. Once they were washed with distilled water and alcohol, a glass fiber filter with a layer of 230 g of olive grove soil were placed on the bottom, the olive grove soil had previously been sieved and fractions less than 2 mm selected.

Once the soil microcosms were prepared, they were kept at different temperatures: 21 °C (room temperature) and 35 °C.

Four types of treatments were set up with the irrigation involving either water or compost tea:

- **Treatment A: (control):** irrigation with only distilled water.
- **Treatment B:** first irrigation with compost tea and the rest with distilled water.

- **Treatment C:** irrigation with only compost tea.
- **Treatment D:** first irrigation with compost tea, then distilled water, day on day 15 irrigated again with compost tea, then water, on day 45 irrigated again with compost tea and finally distilled water.

The experimental set up was performed over 90 days, during which 7 samplings were carried out (on the 4, 8, 15, 30, 45, 60 and 90th days), obtaining therefore a total of 56 microcosms (2 temperatures * 4 treatments * 7 samplings).

Several analyses were performed on each of the microcosms:

Chemical and physicochemical: measurement of the pH, a measure of electrical conductivity, % CaCO₃, organic carbon (OC), determining the total nitrogen, determining the phosphorus available and determining the potassium available.

Microbiological: enumerating the aerobic mesophilic microorganisms and determining the activity of several enzymes, such as the alkaline and acid phosphatase and arylsulfatase.

Assimilable heavy metal content

A biodiversity study: was carried out where some of the microbial groups of interest that can be found in agricultural soils were assessed was held then. These groups were: total bacteria, ammonium-oxidising bacteria (AOB) ammonium-oxidising archaea (AOA) and ALP-harboring bacteria.

Due to the high number of microcosms, the samples that were chosen corresponded to the 4, 8, 30 and 90th days because that was where the most significant changes occurred.

Thus, the first step was the extraction of the total bacterial DNA from the chosen microcosms using the FastDNA kit for soil following the steps in accordance with the Protocol of the manufacturer. The following step

after the extraction of DNA was the amplification of the genes corresponding to the groups of interest by polymerase chain reaction (PCR).

The separation of DNA fragments by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed. Sixty ng of PCR products were loaded in polyacrylamide gels containing a specific denaturing gradient. Once the gels were dyed and dried, they were scanned for further analyses of the DGGE pattern.

Finally, a real-time quantitative PCR was assessed to quantify total bacteria, AOA and AOB groups. The procedure follows the general principle of polymerase chain reaction; its key feature is that the amplified DNA is detected as the reaction progresses in “real time”. This is a new approach compared to standard PCR, where the product of the reaction is detected at its end.

In order to amplify small amounts of DNA, the same methodology is used as in conventional PCR using a DNA template, at least one pair of specific primers, deoxyribonucleotides, a suitable buffer solution and a thermo-stable DNA polymerase. A substance marked with a fluorophore is added to this mixture in a thermal cycler that contains sensors for measuring the fluorescence of the fluorophore after it has been excited at the required wavelength allowing the generation rate to be measured for one or more specific products. This allows the rate of generation of the amplified product to be measured at each PCR cycle.

Quantitative PCR can also be applied to the detection and quantification of DNA in samples to determine the presence and abundance of a particular DNA sequence in these samples. This measurement is made after each amplification cycle, and this is the reason why this method is called real-time PCR (that is, immediate or simultaneous PCR).

The results of the study reveal that the addition of molasses to the compost tea has a positive effect on the number of CFU mL⁻¹. This is due to the fact that the increase that occurs in this value is superior to that when no molasses is added. However, during the first 48 hours of

the maceration process, the pH of the compost tea suffers significant changes as a result of the production of acids derived from the microbial activity of the molasses (compound rich in sugars). The same behaviour was obtained by Shrestha et al. (2011), when using molasses as a supplement in compost tea derived from compost made from the contents of the rumen.

Thus, and taking into account the data, it was determined that compost tea made with no molasses maintains the system much more stable, placing it at pH levels closer to neutral and avoiding the possible undesirable effects that are difficult to control. This led to the decision of making compost tea without adding molasses and over 5-days.

Under these conditions a compost tea whose final pH was 8.4, which had a NP content of 0,006%, and 0,024% of K and whose quantity of mesophilic aerobic bacteria stood at $5,3 \cdot 10^6$ CFU mL⁻¹.

Thirty bacterial strains were isolated from the compost tea and subsequently grown in a culture medium with different concentrations of Cu, Pb, Cd and Zn.

An appreciation at a general level, noted that the tolerance of the strains tested is in order of Cu > Pb > Zn > Cd. These results are similar to the ones achieved by Colak et al. who tested the resistance of the strains *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* against various concentrations of Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ y Pb²⁺. Colak et al. concluded that these strains are highly resistant to copper and lead.

More specifically, over 50% of the strains showed growth at a maximum concentration of 4 mM of Cu while the rest showed growth at a maximum concentration of 8 mM. However, none of the 30 strains tested showed growth above this concentration. The metal Pb behaved very similarly to copper and approximately 50% of the isolates tolerated concentrations in the range 8-16 mM. In the case of Zn, only strain 3, presented the maximum growth at a concentration of 8 mM while most of the remaining strains grew up to a maximum concentration of 4 mM.

Finally, it should be noted that cadmium was the metal that had the greatest level of toxicity. In this sense, it was observed that most strains were unable to grow at concentrations of Cd greater than 4 mM.

Based on data from the CMI of each strain, it was determined that 8 of the 30 tested strains, identified as *Rhodococcus sp.*, *Virgibacillus sp.*, *Leifsonia shinshuensis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus sp.*, *Achromobacter sp.* and *Oceanobacillus sp.*, were the most resistant to the presence of Pb, Cd, Cu and Zn. In addition, the strain identified as *Rhodococcus sp.*, stood out as the most resistant strain as it showed growth even with the highest concentration levels of all the heavy metals tested.

In addition to the resistance to the presence of heavy metals in the medium, the strain *Rhodococcus sp.* was able to remove and collect, both on the surface of the cell as well intracellularly, Cu, Zn, Cd and Pb, suggesting that these heavy metals are actively bioaccumulated; thus making it possible so as to be exploited in the process of bioremediation, biosorption and bioaccumulation.

With regards to the experiments carried out in the microcosms it was necessary to perform a large statistical study, due to the large number of dependent and independent variables that were handled.

Therefore, the data obtained from descriptive statistics show a few coefficients with a variation between 1% and 113%, which reflects the coexistence of variables with a slight deviation from its mean value, while others that are extremely variable.

Moreover, the correlation coefficients highlight, not only the obvious relationship between number of days and the irrigation amount, but also the relationship between number of days and basic phosphatase ($r = 0,71$), between the increase of EC and the amount of total irrigation ($r = 0,63$) and the inverse relationship between temperature and arylsulfatase ($r = - 0,63$).

Models of multiple linear regressions for each variable have also been tested. The most significant were those related to the EC, CFUs, basic phosphatase activity and arylsulfatase activity, together with the heavy metals Mn and Sc.

In order to clarify the relationships and find the combination of variables which best explained the variability of our data, a factorial analysis was performed. The outcome of the analysis provides 9 factors with an eigenvalue greater than 1 that explains 81.1% of the variability of the data, the rest of which have little influence on the system.

Both factors 1 and 2 respectively, with an explained variance percentage of 24.4 and 17.7, refer to “incubation days”. Factor 3 is clearly related to the factor “temperature”. Factor 4 could represent the “irrigation”, with the inverse relationship between mL water (-0,795) and mL of tea (0,607) added. Factor 5, which accounts for 6.7% of variance and includes the variables pHwater (0,652) and pHCIK (0,843), could refer to “soil reaction”. Factor 6 is related to “organic carbon”; and factors 7 (4.4% of variance) and 8 (3.2% of variance), are linked to those “metals” (Sn, In) that have a low influence on the other factors. Finally, factor 9, groups together the variables “carbonates and N”, that show an inverse relationship.

The multifactorial variance analysis was used to determine the factors and interactions that had a statistically significant effect on the soil variables studied. The factor “treatment” refers to those explained above (A, B, C and D); the factor “day” is related to the different sampling times; and the factor “temperature” corresponds to the two incubation temperatures. The two most important sources of variation in the data were found to be treatment and days.

The trend over time of the variables was:

- * **pH:** values are very similar in the 4 treatments and relatively homogeneous over time, although a slight increase is observed in the first 15 days.
- * **Electrical conductivity:** in general terms the values showed a tendency to increase within normal limits.
- * **Calcium carbonate equivalent:** Its evolution is parallel and shows a behaviour very similar to the pH, with its lowest values coinciding with the lowest pH values.
- * **Organic carbon:** the variations observed are not notable.
- * **NPK macronutrients:** In the treatments receiving more compost tea, a tendency of increasing mean P values is observed, a decrease in the case of K and a sustainable content of N.
- * **Mesophilic aerobic microorganisms count:** an increase in the number of microorganisms in the soil at 4 days and a lower content in the rest of the days is observed, normal behaviour going from an important water deficit to optimum humidity.
- * **Acid phosphatase activity:** the application of compost tea meant an increase of activity with respect to the value of the initial treatment sample although the mean significant differences by treatments are observed only between A and D.
- * **Basic phosphatase activity:** there is a significant increase of the basic phosphatase activity at the end of the experiment, which indicates an accumulation process of this exoenzyme in the microcosms.
- * **Arylsulphatase activity:** irrigation with compost tea (treatment B, C and D) has favoured the activity of this enzyme in the soil.

- * **Assimilable Mn:** there is a general trend of the assimilable Mn decreasing over time.
- * **Assimilable V:** Although with oscillations, the amount of assimilable V in the soil at the end of the experiment is superior to the initial amount.
- * **Assimilable Cu, Pb, Zn and Cd:** although to varying degrees, the observed general trend is that they decrease over time.

In order to find the variables that were most affected by the experimental conditions, a discriminant analysis was used. Firstly, significantly predictor variables were identified, through a selection algorithm based on stepwise regression, and then adjusted to the discriminant functions that maximise the distances between levels or functions. The relative magnitude of the standardised coefficients in the respective equations is used to determine how the independent variables are being used to discriminate among the functions.

The seven-discriminant variables of the calculation process were significantly adjusted to 3 functions. Of these, the first two explain 92% of the variance among levels. Function 1 clearly discriminates the treatment A from the rest of the treatments. Function 2 ordered the treatments from highest to lowest C, D, A, B. Finally, the two temperature groups are significantly differentiated by mL of water, mL of tea, O.C., T1 and Bi grouped in a single function.

Finding variation factors in all of the data invites one to analyse the relationships between variables under uniform conditions. Separating the data by treatment and temperature, an increase is observed in the value and number of correlation coefficients with respect to the analysis of the population.

The increase in the statistical significance for the relationship between variables when analysed according to the type of treatment, is an interesting fact that can be interpreted in two ways. Firstly, it highlights

the important influence that the compost tea irrigation model has on the responses of the microcosms soil, having even more of an influence the irrigation system than the amount of tea added as discussed previously; and secondly validates the proposed experiment that tested three types of irrigation.

To complete the study, and keeping in line with what was done with the total data, linear regression models for each of the physicochemical and microbiological variables and for Sc and Mn were carried out.

* **Treatment A:** Bearing in mind the correlations in the control (A) at 21 °C indicates that, naturally, soil moisture and the passage of time entail a drop in pH, O.C. and CFUs, while increasing EC, P, and both acid and basic phosphatase activity. Arysulphatase activity is also favoured with the decreasing pH and the increase in P content. For its part, the multiple regression equations for treatment A show that the EC the O.C., basic phosphatase and arylsulphatase can be predicted from the days of the experiment, the incubation temperature and the mL of water used in the irrigation.

* **Treatment B:** more correlation indexes can be seen levels at 21 °C than at 35 °C. Again, it is observed that O.C. decreases with time and irrigation and increases basic phosphotase; but at 21 °C there is now also a decrease in K. With regards to the multiple regression equations, in this treatment the variables that can be predicted best, based on the test variables, are the O.C., basic phosphatase activities and arylsulphatase and Mn with a fairly high degree of significance.

* **Treatment C:** the relationship of time and irrigation with EC, O.C.CO reappears, basic phosphatase and metals, but changes the sense of the relationship with the O.C. In this case the regression equations show a predictive value for CE, CO, heavy metals Sc and Mn and basic phosphatase activity.

- * **Treatment D:** there is no relationship between humidifying and time with the O.C., but there is with K, EC, the basic phosphatase activity and the metals Sc and Mn.

In general, the results suggest that humidifying produces a slight decrease of the pH and an increase in the EC and enzyme activity as well as a degradation of the organic matter. A regular trend of the O.C is not observed in the different treatments since it declines over time in A and B, but increases in C and loses its relationship in D. In what macronutrients are referred to, it should be noted that the decrease of K with humidifying time is only significant in B and D whilst P increases along with the content of phosphatases. Moreover, there are no significant correlations between N and the irrigation water, but there are with the tea as it promotes the consumption of N. The relationship between water and enzymes is also lower than with the tea and enzymes.

With respect to the microbiological part, of note is the decline in the number of mesophilic aerobic microorganisms present in the soil that only occurs in treatment A, but not when tea is added and that basic phosphatase always increases with the time of humidifying, regardless of treatment and temperature.

Finally, and focusing on the heavy metals it is worth noting that the appearance of Sc and Mn in the correlation tables only happens when the compost tea is added (treatment B, 21 °C). Its coefficients are higher in C and D. It has been found that Sc accumulates over time while Mn decreases. In addition, the relationship between metals and pH is weak, and when it occurs it is discrepant ($\text{pH}^{\text{water-Sc}}$ in D-35 °C = -0,74; pHClK-Sc in B-35 °C = 0,82), which seems to mean that the availability of metals is not dependent on the pH.



Introducción

1. RESIDUOS

El hombre, desde sus inicios, ha utilizado la vida vegetal y animal, además de otras materias inertes para su propio beneficio. El ser humano toma recursos del medio para proveerse de alimento, hogar, vestido, etc. De igual forma, los combustibles fósiles, el viento o el agua pueden ser utilizados como recursos naturales para la producción de energía.

Aunque los primeros humanos sin duda vivieron más o menos en armonía con el medio ambiente al igual que los animales, su alejamiento de la vida salvaje, con la primera revolución agrícola, les permitió modificar o eliminar la vegetación natural, y con la domesticación y pastoreo de animales herbívoros comenzaron a producir un impacto sobre el medio.

El cultivo de plantas originó también la destrucción de la vegetación natural para hacer hueco a las cosechas y la demanda de leña condujo a la desnudación de montañas y al agotamiento de bosques enteros. El pastoreo llevó al sobrepastoreo, los animales salvajes se cazaban por su carne y eran destruidos en caso de ser considerados plagas o depredadores.

Mientras las poblaciones humanas siguieron siendo pequeñas y su tecnología modesta, su impacto sobre el medio ambiente fue solamente local. No obstante, al ir creciendo la población y mejorando y aumentando la tecnología, aparecieron problemas más significativos y generalizados. El rápido avance tecnológico producido tras la Edad Media culminó en la Revolución Industrial, que trajo consigo el descubrimiento, uso y explotación de los combustibles fósiles, así como la explotación intensiva de los recursos minerales de la Tierra.

Fue con la Revolución Industrial cuando los seres humanos empezaron realmente a cambiar la faz del planeta, la naturaleza de su atmósfera y la calidad de su agua. Hoy, la demanda sin precedentes a la que el rápido crecimiento de la población humana y el desarrollo tecnológico someten al medio ambiente, está produciendo un declive cada vez más acelerado en la calidad de éste y de su capacidad para sustentar la vida. La necesidad del mundo desarrollado, de vivir siguiendo un modelo de calidad de vida basado en la posesión indiscriminada de bienes materiales, ha provocado y provoca un deterioro medioambiental nunca visto anteriormente. Todos y cada uno de los rincones de la Tierra sufre, de alguna u otra manera las consecuencias del uso irresponsable que el hombre hace de los recursos naturales.

1.1. Residuos sólidos

Un residuo sólido se define como cualquier objeto o material de desecho que se produce tras la fabricación, transformación o utilización de bienes de consumo y que se abandona después de ser utilizado. Estos residuos sólidos son susceptibles o no de aprovechamiento o transformación para darle otra utilidad o uso directo. El origen de estos residuos se deben a las diferentes actividades que se realizan día a día, pero la mayor parte de ellos es generada en las ciudades, más concretamente en los domicilios donde se producen los llamados residuos sólidos urbanos, que proceden de las actividades domésticas en casas y edificios públicos como los colegios, de oficinas, la demolición y reparación de edificios, etc.

Dependiendo de la fuente y actividad generadora podemos clasificarlos como sigue:

Residuos no peligrosos: Son aquellos producidos por el generador en cualquier lugar y en desarrollo de su actividad, que no presentan riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

- * **Biodegradables:** Son aquellos restos químicos o naturales que se descomponen fácilmente en el ambiente. En estos restos se encuentran los vegetales, residuos alimenticios no infectados, papel higiénico, papeles no aptos para reciclaje, jabones y detergentes biodegradables, madera y otros residuos que puedan ser transformados fácilmente en materia orgánica.
- * **Reciclables:** Son aquellos que no se descomponen fácilmente y pueden volver a ser utilizados en procesos productivos como materia prima. Entre estos residuos se encuentran: algunos papeles y plásticos, chatarra, vidrio, telas, radiografías, partes y equipos obsoletos o en desuso, entre otros.
- * **Inertes:** Son aquellos que no se descomponen ni se transforman en materia prima y su degradación natural requiere grandes períodos de tiempo. Entre estos se encuentran algunos tipos de papel como el papel carbón y algunos plásticos.
- * **Ordinarios o comunes:** Son aquellos generados en el desempeño normal de las actividades. Estos residuos se generan en oficinas, pasillos, áreas comunes, cafeterías, salas de espera, auditorios y en general en todos los sitios del establecimiento del generador

Residuos peligrosos: es aquel residuo que, en función de sus características de Corrosividad, Reactividad, Explosividad, Toxicidad, Inflamabilidad, Volatilidad y Patogenicidad (CRETIVP), puede presentar riesgo a la salud pública o causar efectos adversos al medio ambiente. Así mismo, se consideran residuos peligrosos los envases, empaques y embalajes que hayan estado en contacto con residuos o materiales considerados como peligrosos, cuando dichos materiales, aunque no sean residuos, exhiban una o varias de las características o propiedades que confieren la calidad de peligroso.

1.2. Residuos líquidos

Los residuos líquidos o aguas residuales se definen como la combinación de agua y residuos procedentes de residencias, instituciones públicas y establecimientos industriales, agropecuarios y comerciales, a los que pueden agregarse de forma eventual determinados volúmenes de aguas subterráneas, superficiales y pluviales. Son esencialmente aquellas aguas de abasto cuya calidad se ha degradado por diferentes usos.

De acuerdo con la fuente generadora se clasifican como:

- * *Domésticos:* Aguas residuales generadas en asentamientos poblacionales, escuelas, instalaciones turísticas, edificios públicos, centros comerciales e instalaciones sanitarias de las industrias, que se componen fundamentalmente de desechos humanos.
- * *Industriales:* Aguas residuales resultantes de la actividad manufacturera, la industria extractiva y el procesamiento de los productos de la actividad agropecuaria.
- * *Agropecuarias:* Aguas residuales generadas en las instalaciones agropecuarias (centros porcinos, vaquerías, granjas avícolas, producciones agrícolas).
- * *Urbanas:* Combinación de aguas residuales provenientes de residencias, edificios públicos, establecimientos comerciales, sistemas de drenaje pluvial y algunas industrias. Se caracterizan por su composición física (contenido de sólidos), química (materia orgánica, inorgánica y gases) y biológica (plantas, microbiota intestinal, algas, hongos, protozoos).

Referente a esta cuestión, cabe destacar la importancia que un correcto manejo de las aguas residuales puede tener, ya que un tratamiento negligente de este residuo podría acarrear muy graves consecuencias

para la salud humana, el medio ambiente y el desarrollo económico. Así la contaminación de las fuentes de suministro, puede aumentar el riesgo de enfermedades infecciosas, el deterioro del agua subterránea y de otros ecosistemas locales.

1.3. Gestión de Residuos

A mediados del s. XX empiezan a producirse los primeros movimientos que avivaban la conciencia medioambiental por el perjuicio producido por el hombre. Esta tendencia, que se mantiene hoy día ha culminado en la búsqueda de soluciones y/o alternativas, tanto a nivel legislativo como social, que reparen el daño ya hecho y eviten que se siga produciendo.

En este punto, una de las prácticas más útiles a este respecto es el reciclaje de residuos a través del aprovechamiento de sustancias contenidas en ellos, o bien de su transformación en otras, se puede contribuir a aliviar los problemas planteados, disminuyendo las dificultades de su eliminación, y facilitando un mejor aprovechamiento de los recursos naturales. De entre todos los tipos de residuos orgánicos que hoy en día se generan, los residuos de origen urbano presentan una de las incidencias más significativas. Se producen diariamente, y de forma puntual, lo cual es una particularidad que les hace merecedores de un tratamiento especial entre todo el conjunto de residuos existentes. Además, su vertido incontrolado da lugar a un tipo de contaminación que difiere de la generada por emisiones gaseosas o líquidas (Díaz-Fierros, 2011).

Es evidente por tanto que, la correcta gestión de residuos supone uno de los pilares fundamentales para la preservación del medio natural.

Uno de los retos medioambientales para las sociedades modernas, tal y como ya se ha expuesto, es dar solución a la problemática asociada a la generación desmesurada de residuos que ha tenido lugar en los últimos 40 años (Cordovil et al., 2005). Es necesario diseñar una serie de actuaciones que tenga en cuenta y sea eficaz a la hora de llevar a cabo un

control y correcta gestión de los residuos producidos en función de su diferente naturaleza. Una gestión adecuada debe llevarse a cabo con criterios técnicos, económicos, medio-ambientales, legales, de ordenación del territorio y de salud pública (Beas Torroba,1991).

Centrando la atención en el tratamiento de aguas, cabe destacar que fue en el siglo XIX, cuando el deficitario tratamiento las aguas residuales de origen urbano empezó a convertirse en un problema serio, ya que las aguas originadas en las ciudades se vertían a ríos que después se empleaban en regadío de zonas agrícolas. Posteriormente, con la introducción de nuevas tecnologías, las aguas han podido ser sometidas a un tratamiento previo antes de su empleo para diferentes usos, incluido el de agua potable (Mara and Cairncross, 1990). Por tanto, dentro de las posibilidades de disponibilidad de los recursos hídricos, se considera a la reutilización un recurso no convencional que puede incrementar los usos del agua, aumentando así no solo la cantidad de usos, sino también el volumen de los recursos hídricos disponibles en la zona. La mejora de la calidad de los efluentes es el elemento clave en la disponibilidad y gestión del agua. El agua regenerada puede sustituir usos que no requieran una calidad excelente, liberando volúmenes de mejor calidad para otros usos más exigentes o para situaciones en los que la necesidad hídrica sea extrema. Todo ello llevaría además a un balance económico favorable.

Consecuencia de todo este contexto, se ha producido la creación de diversas herramientas legislativas, tanto en el marco nacional como internacional para la regulación de residuos. Así pues, en España se elaboró la Ley 22/2011, de 28 de julio, *de residuos y suelos contaminados*, que actualiza y mejora el régimen previsto en la anteriormente vigente Ley 10/1998, de 21 de abril. Además la presente Ley en el marco de los principios básicos de protección de la salud humana y del medio ambiente, orienta la política de residuos conforme al principio de jerarquía en la producción y gestión de los mismos, maximizando el aprovechamiento de los recursos y minimizando los impactos de la producción y gestión de residuos promoviendo la implantación de medidas de prevención,

reutilización y reciclado de los residuos (BOE).

A nivel europeo, se elaboró la Directiva 91/271/CEE *sobre tratamientos de residuos urbanos* por parte de los Estados Miembros de la Unión Europea, que obliga a todos los países integrantes a depurar todas sus aguas residuales en el año 2015.

Asimismo, la Directiva 2000/60/CE del parlamento europeo y del consejo de 23 de octubre de 2000, establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, definiendo agua como un bien no comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal.

Para lograr el cumplimiento de la legislación vigente, los municipios de más de 2000 habitantes deben contar con una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), (MAGRAMA). La depuración de mayores cantidades de agua, provoca irremediablemente una gran producción de lodos, que aunque es un biorresiduo rico en materia orgánica resultante del proceso de depuración plantea enormes problemas de gestión como veremos más adelante.

1.3.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR)

Una EDAR es una instalación donde el agua residual se somete a un proceso en el que, por combinación de diversos tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, se consigue eliminar en primer lugar las materias en suspensión, las sustancias coloidales y, finalmente, las sustancias disueltas.

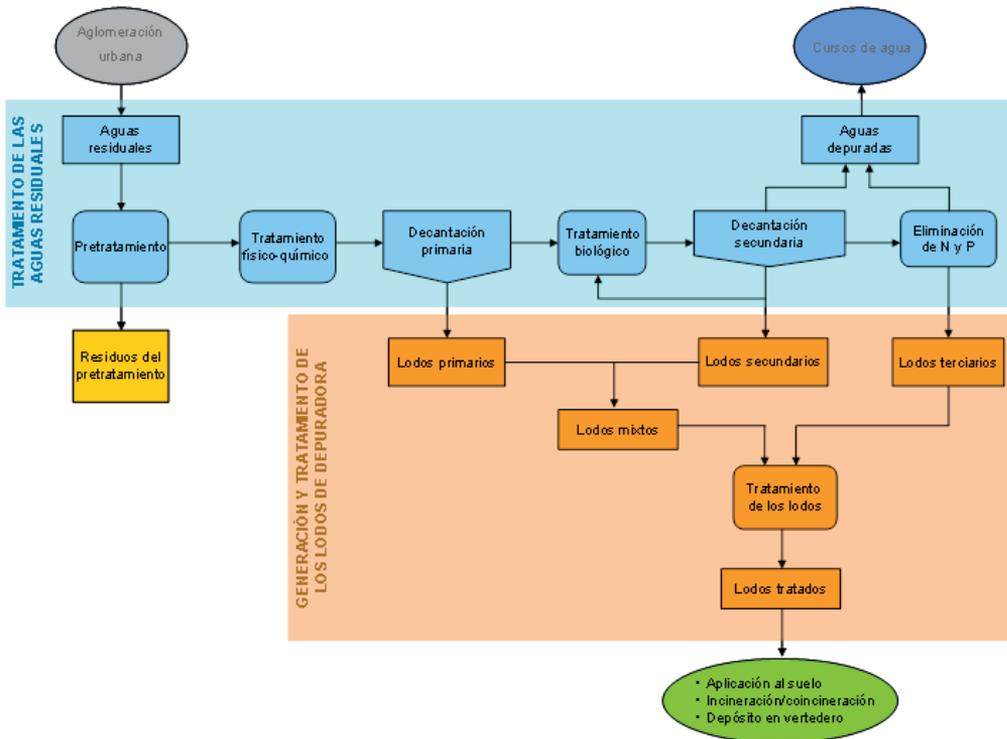


Figura 1.- Croquis de funcionamiento de una EDAR (MAGRAMA)

En las EDARs, podemos encontrar tres líneas de tratamiento independientes, la línea de aguas, la línea de fangos y en ocasiones una tercera línea, la línea de gas:

Línea de Aguas: engloba todos los procesos a los que se ve sometida el agua a su llegada a la planta de tratamiento

Pretratamiento: Ocurren los tratamientos físicos que consisten fundamentalmente en separar la contaminación sólida de gran tamaño presente en el agua (objetos, grasas y arenas)

Decantación primaria: Eliminación de las partículas de menor tamaño (sólidos en suspensión) que no hayan podido eliminarse en el pretratamiento.

Tratamiento Biológico: la eliminación o reducción de la contaminación orgánica y la coagulación y eliminación de los sólidos coloidales no decantables. Estos procesos se producen por la intervención de microorganismos que actúan sobre la materia orgánica e inorgánica suspendida, disuelta y coloidal existente en el agua residual, transformándola en sólidos sedimentables que pueden separarse fácilmente.

Línea de Fangos: Engloba los procesos de tratamiento de los subproductos sólidos generados en la línea de aguas.

Espesamiento: Concentración del fango para obtener un producto con la menor cantidad de agua posible.

Digestión: Proceso por el que las bacterias anaeróbicas descomponen la materia orgánica presente en los lodos. Durante el proceso se produce biogás que podrá ser usado en una planta de cogeneración térmico-eléctrica.

Deshidratación: centrifugación de los lodos para eliminar el agua que pueda quedar

Línea de gas: Parte donde se transforma el gas generado.

Cogeneración: uso del biogás producido en la digestión de lodos gracias a su alto poder calorífico para la producción de energía eléctrica y calorífica, ahorrando así en combustibles fósiles.



Figura 2.- Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR)

1.4. Lodos de depuradora

Los lodos de depuradora son un subproducto sólido, rico en materia orgánica y otros nutrientes como fósforo y nitrógeno, producido durante el proceso de depuración de aguas (Rundong et al., 2014).

El cumplimiento de la legislación vigente ha provocado un aumento en la cantidad de agua tratada, lo que inevitablemente trae apareado un aumento en la cantidad de lodos de depuradora generados.

Las características de los lodos obtenidos dependen de la contaminación original del agua y también de las características técnicas de los procesos llevados a cabo. Por tanto, el lodo obtenido concentra una gran cantidad de sustancias procedentes de las aguas tratadas, algunas de las cuales pueden volver a ser reutilizadas (materia orgánica, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio...) mientras que otros compuestos son contaminantes (metales pesados, productos químicos y patógenos).

Los lodos procedentes de las plantas de tratamiento de aguas convencionales (EDAR) se generan en las distintas fases del tratamiento del agua. La cantidad de lodo generado y su composición varía en función del proceso en el tratamiento de aguas. De esta forma, los lodos pueden ser clasificados en función de la etapa del tratamiento de aguas en la que se han producido como:

Lodo primario: Se genera como consecuencia del tratamiento primario de las aguas residuales. La composición del lodo depende de las características del área de recogida de las aguas. El lodo primario contiene generalmente una gran cantidad de material orgánico, vegetales, frutas, papel, etc. La consistencia se caracteriza por ser un fluido denso con un porcentaje en agua que varía entre 93 % y 97 %.

Lodo secundario: Se generan en el tratamiento secundario, como consecuencia del tratamiento biológico del agua.

Ambos tipos de lodo contienen biomasa viva y muerta además de partes minerales y orgánicas adsorbida y almacenada.

Para llevar a cabo una correcta y adecuada gestión de los lodos es necesario conocer las características del lodo que va a ser procesado. En la tabla 1, (Fytili y Zabaniotou, 2006) se muestra la composición química y propiedades típicas de los distintos tipos de lodos.

Tabla 1.- Composición química y propiedades típicas de los diferentes lodos de depuradora.

	Lodo no tratado		Lodo digerido		Lodo activado
	Rango	Típico	Rango	Típico	
Sólidos totales (ST), %	2-8	5	6-12	10	0.83-1.16
Sólidos volátiles (% ST)	60-80	65	30-60	40	59-88
Proteínas (% ST)	20-30	25	15-20	18	32-41
Nitrógeno (% ST)	1.5-4	2.5	1.6-6	3	2.4-5
Fósforo (% ST)	0.8-2.8	1.6	1.5-4	2.5	2.8-11
Potasio (% ST)	0-1	0.4	0-3	1	0.5-0.7
Celulosa (% ST)	8-15	10	8-15	10	-
Hierro	2-4	2.5	3-8	4	-
Silicio (% ST)	15-20	0	10-20	-	--
Alcalinidad (mg/L CaCO ₃)	500-1500	600	2500-3500		580-1100
Ácidos orgánicos (mg/L Hac)	200-2000	500	100-600	3000	1100-1700
Contenido energético	10000-12500	11000	4000-6000	200	8000-10000
pH	41856	6	6.5-7.5	7	6.5-8

1.4.1. Mecanismos de gestión de los lodos

Existen diferentes vías de gestionar los lodos procedentes de las EDARs con diferentes ventajas e inconvenientes.

Depósito en vertederos: Hay dos posibilidades cuando nos referimos al depósito en vertederos de los lodos: mono-depósitos, donde solo los lodos son depositados; y depósitos de mezcla, donde el depósito es también usado para residuos municipales. Esta opción es poco recomendable ya que los depósitos generan lixiviados al suelo y al agua y emisiones de gases (principalmente de efecto invernadero como metano y dióxido de carbono).

Aplicación al suelo: Debido al gran aporte de nutrientes, los lodos de depuradora se presentan como una fuente barata de nutrientes de N y P (Miao-Miao et al., 2008; Theodoratos et al., 2012). Además, otros estudios han comprobado los beneficios que la materia orgánica que contienen ejerce sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo. A la hora de tratar el suelo con lodos, se deben tener en cuenta las necesidades de los cultivos y no causar perjuicio sobre la calidad de los suelos ni la producción agrícola (Bernal-Calderón y Gondar-Bouzada, 2008).

La aplicación directa de lodos sobre el suelo ha sido ampliamente estudiada incluyendo usos como cubiertas de vertederos, rehabilitación de minas y enmiendas de suelo (Hong et al., 2009; Johansson et al., 2008; Murray et al., 2008)

A este respecto, la EPA (Environment Protection Agency), clasifica los lodos atendiendo a una serie de normas (Tabla 2) que determina su uso potencial sobre los distintos tipos de suelo (Tabla 3). Los lodos de clase A no contienen niveles detectables de patógenos y niveles muy bajos de metales pesados, esta clase de lodos poseen unos estándares de calidad y pueden ser utilizados para todo tipo de cultivos. Los lodos de clase B, muestran cierta cantidad de patógenos por lo que su uso como enmienda está más limitado. Por último, los lodos de clase C presentan niveles más altos de contaminantes por lo que su utilización se limita a espacios en los que la interacción con el público es menor como suelos forestales.

Tabla 2.- Clasificación de los lodos en función de los límites máximos permisibles para parásitos y patógenos en lodos de depuradora

Clase	Indicador bacteriológico de contaminación		
	Coliformes NMP/g en base seca	Patógenos Salmonella sp. NMP/g en base seca	Parásitos Huevos del helmintos NMP/g en base seca
A	Menor a 1000	Menor a 3	Menor a 1
B	Menor a 1000	Menor a 3	Menor a 10
C	Menor a 2000000	Menor a 300	Menor a 35

Tabla 3.- Posibles usos de los lodos en función de su categoría

Tipo	Clase	Posibles Usos
Excelente	A	Usos urbanos con contacto directo con el público
		Usos para lodos de clase B y C
Excelente o bueno	B	Usos urbanos sin contacto directo con el público
		Usos para lodos de clase C
Excelente o bueno	C	Usos forestales
		Mejora de suelos Usos agrícolas

Producción de biogás por medio de procesos anaerobios: el biogás es una fuente de energía renovable que se produce durante la digestión anaeróbica de la materia orgánica presente en los lodos por parte de los microorganismos (Nghiem et al., 2014). A pesar de que hasta hace poco se le ha prestado poca atención a la producción de biogás por digestión anaeróbica (Barber, 2012), son numerosos los autores que ven en esta práctica grandes posibilidades energéticas.

Tratamientos térmicos: en este apartado se incluyen la combustión o incineración y más recientemente la pirolisis. Debido a las limitaciones legales concernientes a la aplicación de lodos sobre el suelo, la incineración se prevé, como uno de los principales usos de los lodos de depuradora a largo plazo (Malerius y Werther, 2003). Estos métodos cuentan con ciertas ventajas como la gran reducción de volumen del residuo, la destrucción térmica de compuestos tóxicos (Khiari et al., 2004), su elevado poder calorífico y la minimización de malos olores. Sin embargo, la incineración no supone una eliminación completa de los lodos ya que aproximadamente un 30% permanece en forma de cenizas que se

pueden utilizar para la producción de materiales de construcción de carreteras o para hacer hormigón (Lisk, 1989).

Compostaje: El compostaje consiste en la descomposición aerobia de una mezcla de materiales orgánicos en condiciones específicas de aireación, humedad, temperatura y nutrientes, y con la intervención de bacterias, hongos y numerosos insectos detritívoros. Este proceso será estudiado en profundidad en un apartado específico de esta introducción debido a su importancia en la realización de nuestros estudios.

A nivel nacional, según los datos del Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente, en 2010 la Comunidad de Madrid es la mayor productora de lodos, seguida de la Comunidad Valenciana, Cataluña y Andalucía (Tabla 4). Por debajo de 100.000 toneladas se encuentran el resto de comunidades autónomas siendo Ceuta y Melilla las que ostentan los datos de producción más bajos. Del total de lodos producidos, casi el 82% son usados sobre suelos agrícolas siendo la incineración el tratamiento menos utilizado.

Tabla 4.- Producción y destino de lodos procedentes de instalaciones EDAR, 2010

Comunidad Autónoma	Lodos de depuradora producidos (t m.s.)	Lodos de depuradora utilizados en	Lodos eliminados en vertedero (t m.s./año)	Lodos incinerados (t m.s./año)
Andalucía	104.979	93.828	9.243	0
Aragón	30.021	9.347	475	20.000
Asturias (Principado de)	2.548	1.688	836	0
Baleares (Illes)	66.811	59.442	7.369	0
Canarias	31.407	0	30.966	0
Cantabria	14.993	8.406	6.425	0
Castilla-La Mancha	48.212	41.394	1.393	0
Castilla y León	62.194	57.847	4.005	0
Cataluña	136.145	108.329	1.295	24.698
Ceuta - Melilla	1.460	0	0	1.460
Extremadura	9.430	6.114	3.316	0
Galicia	99.520	84.722	5.589	2.405
La Rioja	17.324	17.303	0	0
Madrid (Comunidad de)	261.222	222.920	5.951	1.155
Murcia (Región de)	20.462	18.752	1.710	0
Navarra (Comunidad Foral de)	9.794	9.475	0	0
País Vasco	20.838	4.814	1.976	13.544
Valenciana (Comunidad)	198.322	184.215	1.802	163
ESPAÑA	1.135.682	928.596	82.351	63.425

1.5. Compost y Té de compost

El compost es el producto estabilizado y desinfectado resultante de un proceso de compostaje, que se define como el proceso de biodegradación de una mezcla de sustratos orgánicos llevados a cabo por una comunidad microbiana compleja, en condiciones aeróbicas y en estado sólido (Insam y de Bertoldi, 2007)

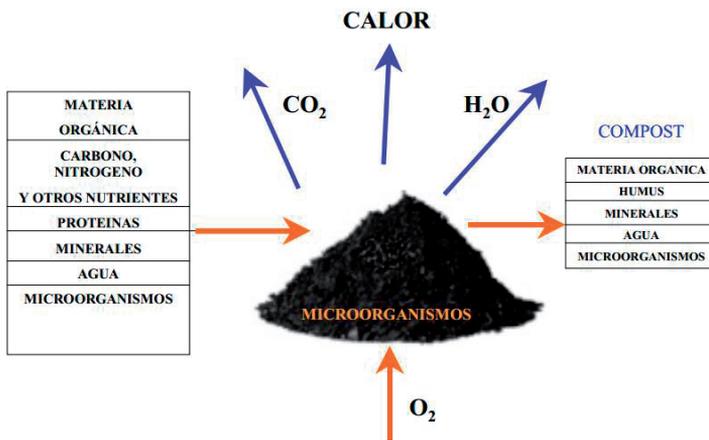


Figura 3.-Esquema representativo del proceso de compostaje (Avendaño Rojas, 2003)

El compostaje se considera una de las tecnologías más respetuosas con el medio ambiente para la gestión de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales (Barrena et al., 2014).

Cuando la materia orgánica se oxida por la acción de los microorganismos, una porción de la energía liberada es capturada y usada para la síntesis de nueva materia celular. Cuando los microorganismos mueren el material celular se convierte en alimento para otros microorganismos y tiene lugar una nueva transformación en dióxido de carbono, agua y nueva materia celular. Este proceso se va repitiendo hasta que la porción de materia orgánica remanente es muy resistente al ataque microbiano. A medida que avanza el proceso de compostaje, los compuestos orgánicos más fácilmente biodegradables van oxidándose y gradualmente van

siendo reemplazados por materiales húmicos cada vez menos biodegradables. Los compuestos más estables que quedan después del compostaje son todavía degradables, pero a una velocidad mucho más pequeña comparada con la velocidad de degradación inicial (Marcote, 1999).

1.5.1. Fases en la elaboración de compost

Durante el proceso de compostaje se suceden una serie de etapas caracterizadas por la actividad de distintos organismos, existiendo una estrecha relación entre la temperatura, el pH y el tipo de microorganismos que actúa en cada fase. Dichas fases se describen a continuación y se detallan en la Figura 4:

Preparación: se acondicionan y mezclan los residuos a tratar con el material de enmienda o de soporte. El material de enmienda es un material orgánico que se añade al subtrato a compostar con la finalidad de obtener un producto de menor peso y aumentar el volumen de huecos para favorecer la aireación, también se puede emplear para aumentar la cantidad de materia orgánica presente en la mezcla. Es material de enmienda: serrín, paja, compost reciclado, cáscara de arroz, etc. El material soporte orgánico o inorgánico es el que se emplea para proporcionar soporte estructural y para aumentar la porosidad de la mezcla con objeto de mejorar la efectividad de la aireación. El más empleado es la astilla de madera, que se puede recuperar y reutilizar. A continuación se coloca formando pilas y comienzan a producirse las fases que generan el compost.

Fase mesófila (< 40°C): se produce una degradación de azúcares y aminoácidos por la acción de grupos de bacterias (*Bacillus* y *Thermus*).

Fase termófila (40-60°C): se degradan ceras polímeros y hemicelulosa por hongos del grupo de los actinomicetos (*Micromonospora*, *Streptomyces* y *Actinomyces*).

Fase de enfriamiento (mesofílica) (< 40°C): Se realiza la degradación de las celulosas y ligninas por bacterias y hongos (*Aspergillus* y *Mucor*).

Fase de maduración: Se estabiliza y polimeriza el humus a temperatura ambiente, desciende el consumo de oxígeno y desaparece la fitotoxicidad.

Afino: Se mejora la granulometría, se regula la humedad, se elimina el material no transformado, se realizan análisis, controles de calidad y en su caso el envasado y etiquetado.

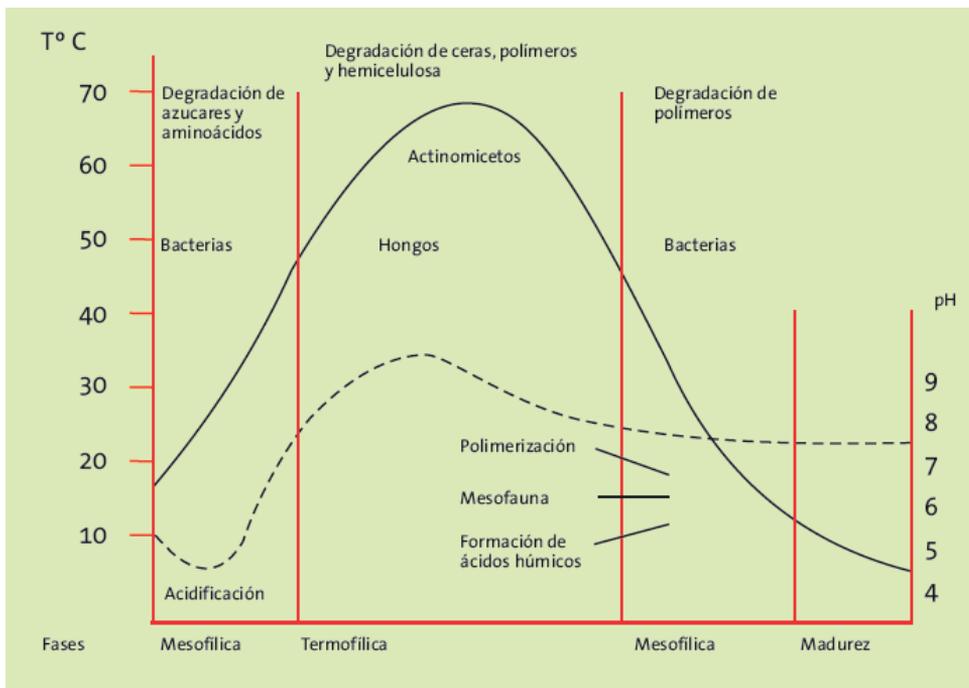


Figura 4.- Evolución de la temperatura (-) y el pH (- -) durante el proceso de compostaje

El pH durante el proceso de compostaje sufre una variación similar a la de casi todos los sustratos. El descenso inicial en el pH (Fase I) coincide con la fase mesofílica. Se puede denominar acidogénica debido a

la gran producción de CO₂ y liberación de ácidos orgánicos. El descenso de pH favorece el crecimiento de hongos y el ataque a las ligninas y la celulosa por estos.

Durante la fase termofílica produce una liberación de amoníaco como consecuencia de la degradación de aminos procedentes de proteínas y bases nitrogenadas y una liberación de bases incluidas en la materia orgánica, el resultado de estos procesos es una subida en el pH retomando su actividad las bacterias llegando a pH incluso cercanos a 9 (Fase de alcalinización).

Tras este incremento del pH se da una liberación de nitrógeno por el mecanismo anteriormente citado siendo aprovechado por otros microorganismos, dando paso a una nueva fase mesofílica debido al descenso de la temperatura donde se inicia la formación de los ácidos húmicos y se induce la fase siguiente denominada fase de maduración donde el pH se estabiliza próximo a la neutralidad y se dan reacciones lentas de policondensación estabilizándose la materia orgánica.

1.5.2. Factores que afectan al proceso de compostaje

Las variables más importantes que afectan a los sistemas de compostaje pueden ser clasificados en dos tipos de parámetros sobre los que hay que establecer un control:

Parámetros de seguimiento: Aquellos que han de ser medidos y seguidos durante el proceso y adecuados en caso de ser necesario

Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato: Aquellos que han de ser medidos y adecuados a sus valores correctos fundamentalmente al inicio del proceso. (Bueno-Márquez et al., 2008)

Parámetros de seguimiento

Temperatura: Cada especie de microorganismo tiene un intervalo de temperatura óptima en el que su actividad es mayor y más efectiva: 15-40 °C para los microorganismos mesófilos y 40-70 °C para los termófilos. Los microorganismos que resulten beneficiados a una temperatura concreta son los que principalmente utilizarán la materia orgánica del residuo, produciéndose un desprendimiento de calor

Humedad: Siendo el compostaje un proceso biológico de descomposición de la materia orgánica, la presencia de agua es imprescindible para las necesidades fisiológicas de cualquier ser vivo incluidos los microorganismos. La humedad de la masa de compostaje debe ser tal, que el agua no llegue a ocupar totalmente los poros de dicha masa (Miyatake et al., 2006), para que se permita la circulación tanto del oxígeno como la de otros gases producidos en la reacción. La humedad óptima para el crecimiento microbiano está entre el 50-70%.

pH: el pH tiene una influencia directa en el proceso de compostaje debido a su acción sobre la dinámica de los procesos microbianos (Sundberg et al., 2004). Los cambios de pH tienen relación con la aireación de la mezcla, concluyendo que un compostaje realizado con la aireación adecuada conduce a productos finales con pH entre 7 y 8; valores más bajos del pH son indicativos de fenómenos anaeróbicos como la fermentación y por tanto de que el material aún no está maduro.

Aireación: para el correcto desarrollo del compostaje es necesario asegurar la presencia de oxígeno, ya que es un proceso aeróbico y la gran mayoría de los microorganismos que en él intervienen son aerobios. Una aireación insuficiente provoca una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente cambio en la descomposición.

Espacio de aire libre: Shulze (1962) utiliza por primera vez el concepto de Espacio de Aire Libre adoptado de la ciencia del suelo, que relaciona los contenidos de humedad, la densidad aparente, la densidad real y la porosidad, es decir, este parámetro tiene en cuenta la estructura física de los residuos.

Parámetros relativos a la naturaleza del sustrato

Tamaño de la partícula: cuanto mayor sea la superficie expuesta al ataque microbiano por unidad de masa, más rápida y completa será la reacción. Por lo tanto, el desmenuzamiento del material facilita el ataque de los microorganismos y aumenta la velocidad del proceso

Relaciones C/N y C/P: Para un correcto compostaje en el que se aproveche y retenga la mayor parte del C y del N, la relación C/N del material de partida debe ser la adecuada. Los microorganismos utilizan generalmente 30 partes de C por cada una de N; por esta razón se considera que el intervalo de C/N teóricamente óptimo para el compostaje de un producto es de 25-35.

Niveles de nutrientes: Además de C, N y P existen otros nutrientes presentes en menor cantidad (micronutrientes). Estos tienen un importante papel en la síntesis de las enzimas, en el metabolismo microbiano y en los mecanismos de transporte intra y extracelular (Miyatake et al., 2006). Se ha comprobado que, en general, entre el inicio y el final del proceso se producen cambios en las concentraciones de los distintos nutrientes, debido a los cambios en la materia orgánica de la masa a compostar.

Materia orgánica: durante el compostaje la materia orgánica tiende a descender debido a su mineralización y a la consiguiente pérdida de carbono en forma de anhídrido carbónico debido a la actividad microbiana. Este descenso de materia orgánica transcurre en dos

etapas fundamentalmente. En la primera se produce un rápido decrecimiento de los carbohidratos, transformándose las cadenas carbonadas largas en otras más cortas. En la segunda etapa, otros materiales más resistentes como las ligninas se van degradando lentamente y/o transformando en compuestos húmicos

Conductividad eléctrica: La conductividad eléctrica de un compost está determinada por la naturaleza y composición del material de partida, fundamentalmente por su concentración de sales y en menor grado por la presencia de iones amonio o nitrato formados durante el proceso (Sánchez-Monedero, 2001). La CE tiende generalmente a aumentar durante el proceso de compostaje debido a la mineralización de la materia orgánica.

1.5.3. Sistemas de compostaje

Hay numerosos sistemas para la obtención de compost. Así y para realizar una primera clasificación general, se pueden establecer dos categorías principales: sistemas abiertos y sistemas cerrados.

Dependiendo del clima del lugar en que se realice el proceso, del tipo de material que estemos tratando, de la disponibilidad de terreno o de la necesidad de acelerar el proceso, se manejan unos u otros sistemas.

Los sistemas abiertos comportan un menor coste y tienen un manejo e instalación más sencillos, mientras que los sistemas cerrados conllevan una infraestructura más complicada y costosa, al tener que realizar una instalación cerrada y emplear una maquinaria más compleja.

Sistemas abiertos

Pilas estáticas: La tecnología para el compostaje en pilas es relativamente simple, y es el sistema más económico y utilizado. Los materiales se amontonan sobre el suelo sin comprimirlos en exceso, siendo muy importante la forma y medida de la pila.

Pilas estáticas con aireación pasiva: para favorecer la ventilación natural de la pila, se emplean estructuras como la que se puede observar en la figura 7 que permiten un mejor flujo de la masa de aire desde la parte inferior hacia la zona superior de la pila. Las pilas son ventiladas por convección natural. El aire caliente que sube desde el centro de la pila crea un vacío parcial que aspira el aire de los lados. El compostaje en pilas simples es un proceso muy versátil y con escasas complicaciones. Se ha usado con éxito para compostar estiércol, restos de poda, fangos y residuos sólidos urbanos. El proceso logra buenos resultados de una amplia variedad de residuos orgánicos y funciona satisfactoriamente mientras se mantiene adecuadamente las condiciones aerobias y el contenido de humedad.

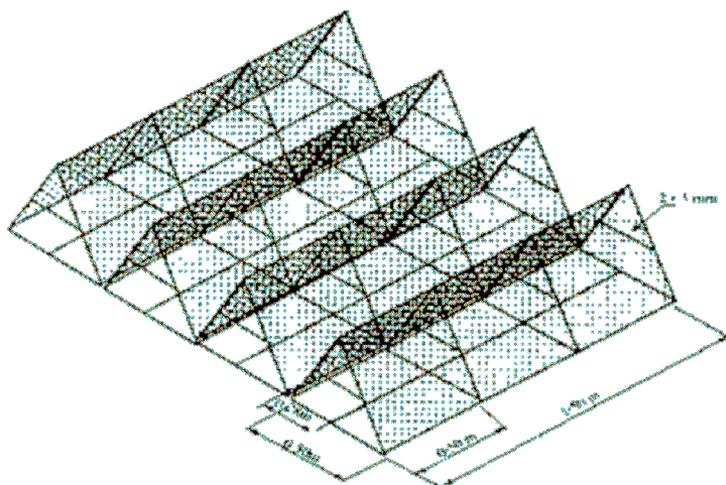


Figura 5.-Estructura para la construcción de pilas estáticas con aireación pasiva

Pilas estáticas con aireación forzada: Estos sistemas permiten tener un mayor control de la concentración de oxígeno y mantenerla en un intervalo apropiado (15-20 %) para favorecer la actividad biológica de los microorganismos aerobios que desarrollan el

proceso. El aporte de oxígeno se realiza por succión o insuflado y puede realizarse de forma continua, a intervalos o ligados a un termostato. Una vez que se constituye la pila, no se toca, en general, hasta que la etapa activa de compostaje sea completa.

Sistemas cerrados

Estos sistemas permiten un mejor control de los distintos parámetros del proceso en la mayor parte de los casos, así como un menor tiempo de residencia y la posibilidad de realizar un proceso continuo. Se caracterizan por llevar a cabo el compostaje en reactores cerrados, siendo el principal inconveniente que generan el elevado coste de inversión de las instalaciones y un continuo gasto de energía. Su principal división se da entre reactores de flujo horizontal y vertical.

Fermentadores verticales: los reactores verticales pueden operar de forma continua o discontinua. En el primer caso, el material a compostar se encuentra en forma de masa única, mientras que en el segundo caso, la masa del compostaje se sitúa en distintos niveles.

En los sistemas cerrados **continuos** se utilizan reactores de 4 a 10 m de altura, con un volumen total de 1000 a 3000 m³. El control de la aireación se realiza en función de la temperatura y de las características de los gases de salida. El tiempo de residencia es aproximadamente de 2 semanas.

Los reactores verticales **discontinuos** constan de un depósito cilíndrico de grandes dimensiones dividido en varios niveles (cada nivel tiene de 2 a 3 m de altura). La materia a compostar se coloca en lo más alto y mediante dispositivos mecánicos se voltea la masa a la vez que va descendiendo al piso inferior. La humedad requerida para llevar a cabo el proceso se consigue o bien por evaporación del agua del material situado en los niveles inferiores, la cual se

encuentra a una mayor temperatura, o bien se dispone de sistemas de suministro de agua. Cuando la fracción orgánica ha descendido al último piso se da por concluida la fermentación y el compost sale al parque de maduración. El tiempo en el fermentador suele ser de una semana. El inconveniente de este tipo de reactores es el elevado costo de instalación y de mantenimiento de la planta.

Fermentadores horizontales: Los reactores de flujo horizontal consisten en un cilindro horizontal que suele tener de dos a tres metros de diámetro y giran a una velocidad de 2 r.p.m a lo largo de su eje longitudinal. El proceso consiste en un tratamiento mecánico continuo. El tiempo de permanencia de los residuos dentro del fermentador esta comprendido entre 24-36 horas durante el cual la materia orgánica inicia el proceso de degradación microbiana. El material resultante es compostado finalmente en pilas o en otra zona del propio reactor. Mediante una cinta transportadora y una grúa móvil se extrae el material una vez compostado. La aireación se realiza por la parte inferior. El tiempo de permanencia total esta comprendido entre 14 y 21 días y normalmente no se necesita tratamiento posterior

1.5.4. Beneficios del compost

Numerosos autores y diversos estudios describen los beneficios que sobre el suelo tiene la aplicación de compost (Diacomo y Montemuro 2009, Gandolfi et al., 2009 y Mehta et al., 2013).

Se ha demostrado que la aplicación de compost a los suelos mejora las propiedades físicas de los mismos, influyendo positivamente sobre la estructura de todos los tipos de suelos así como en la porosidad, la capilaridad del agua a través del suelo y el crecimiento de las raíces. Además, incrementa la formación de humus y protege el suelo de la erosión, la sequía, la contaminación y de otras condiciones extremas.

A nivel biológico la adición de compost estimula la diversidad y actividad microbiana en el suelo reduciendo la de otros patógenos como los nematodos.

También se ha visto que favorece las propiedades químicas, aumentando el contenido en macronutrientes y micronutrientes, la capacidad de intercambio catiónico.

El nitrógeno contenido en el compost se encuentra en forma asimilable por las raíces, con la ventaja de ser retenido en la capa cultivable del suelo, evitando ser arrastrado por las aguas de lluvia o de riego a capas más profundas fuera del alcance del sistema radicular.

En los últimos tiempos, se ha intentado mejorar el uso agrícola del compost a través de un derivado líquido del mismo denominado “té de compost” el cual presenta aspectos muy significativos.

1.6. Té de compost

El té de compost es un extracto acuoso del compost de alta actividad biológica. Se utiliza como fertilizante, debido a que contiene nutrientes solubles y microorganismos beneficiosos (Martin Riegel , 2008). Algunos de los beneficios que ofrece su uso, es el control de patógenos y la promoción del crecimiento vegetal.

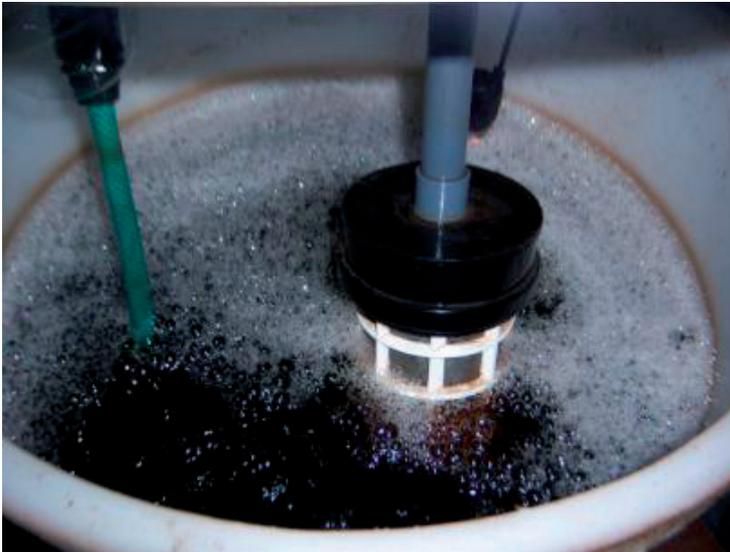


Figura 6: Té de compost durante el proceso de elaboración

Un amplio número de factores, entre los cuales se encuentra el tipo de proceso de elaboración del compost, influyen en los componentes químicos y microbiológicos del té de compost. Así, un compost de calidad, permitirá fabricar un té de compost con alta calidad, si es elaborado con la metodología correcta. Por esta razón, las técnicas de producción de té de compost están basadas en la regulación de ciertos parámetros para generar condiciones más favorables para la presencia y desarrollo de organismos beneficiosos en el producto final (Martin Riegel, 2008). La supresividad de enfermedades generadas por el compost y el té de compost se atribuye, esencialmente, al componente biótico presente con actividad antagónica contra patógenos.

Esencialmente, el té de compost incluye bacterias, hongos, protozoos y nematodos beneficiosos. Cuando el té de compost es esparcido sobre la superficie del suelo, aporta dichos organismos ocupando nichos espaciales y por tanto compitiendo con otros organismos existentes por antagonismo. Idealmente, el té de compost debe tener un alto número de microorganismos y una alta diversidad microbiana que cumplen con muy diversas funciones.

1.6.1. Métodos de elaboración del té de compost

Hay dos métodos fundamentales de producción de té de compost, el que requiere aireación ACT (Aerated Compost Tea) y el que no la requiere NCT (Non-aerated Compost Tea).

Independientemente de la aireación, en ambos métodos existe una fermentación intencionada del compost en agua durante un tiempo determinado, entendiendo por fermentación al cultivo de microorganismos. Ambos métodos de producción de té de compost requieren de un recipiente de fermentación, compost, agua.

Existe un debate acerca de la necesidad de la aireación durante la producción de té de compost. Los métodos de producción aireados están asociados con tiempos de producción reducidos, mientras que los no aireados están relacionados con bajos costes, bajos requerimientos

de energía y un mejor control de enfermedades en plantas (Scheuerell et al, 2002).

La producción aireada de té, requiere de maquinaria y energía para el continuo aporte de aire. Los diseños más comunes incluyen el lavado con agua que pasa a través de una bolsa porosa de compost, la cual está suspendida sobre el contenedor abierto, donde se inyecta aire directamente o a través de la difusión de finas burbujas. Otro mecanismo muy empleado consiste en la suspensión del compost en el tanque de fermentación y airear activamente y/o recircular el líquido.

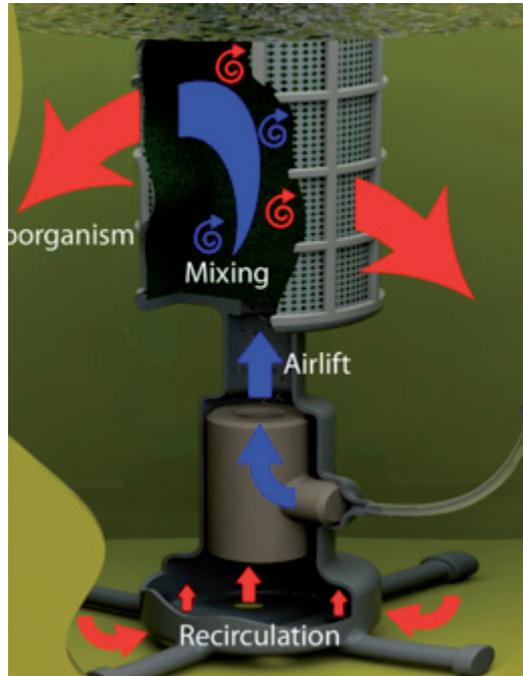


Figura 7.- Esquema del sistema de aireación del té de compost

Las técnicas de NCT se han realizado tradicionalmente mezclando un volumen de compost con 4 a 10 volúmenes de agua en un contenedor abierto, agitando inicialmente la mezcla, y dejándola luego a 15-25°C por al menos 3 días. Scheuerell et al, (2002) defienden la agitación de la mezcla cada dos a tres días durante la fermentación para posibilitar la liberación de los microorganismos de las partículas del compost.

Es necesario indicar, que hasta el día de hoy, la mayoría de procesos de elaboración de té se han basado en técnicas de no aireación, ya que son tecnologías más simples que requieren menos consumo de energía y no necesitan un equipo de aireación especializada para la producción del té por lo que la información aportada se centra en gran parte en este mecanismo (St. Martin y Brathwaite, 2012).

1.6.2. Aplicación del té de compost

Hay dos formas diferentes, pero no excluyentes, de aplicación del té de compost: por riego a través del suelo, o como pulverización foliar.

Aplicación Foliar: Se aplican a las zonas foliares de la planta por lo que organismos que causan enfermedades compiten por los sitios de infección o recursos alimentarios. El té de compost se aplica normalmente sin dilución, aunque el agua se utiliza a menudo como un “portador”.

La concentración de organismos en el té es crítica, por lo que mantener esa concentración es importante. Si el té se diluye, puede ocurrir que la cantidad de té rociada sobre las hojas sea inadecuada. El factor crítico con respecto a las aplicaciones foliares es la cobertura de la superficie de la hoja, de esta forma los sitios de infección de la hoja podrán ser ocupados por organismos beneficiosos, no dejando lugar para el ataque de los microorganismos perjudiciales (Ingham, 2005).

Aplicación edáfica: cuando el té de compost se añade directamente al suelo, éste contribuye al desarrollo de la barrera biológica alrededor de las raíces, proporcionando nutrientes para mejorar el crecimiento de la planta, el ciclo de nutrientes y la vida en la tierra en general, con efectos beneficiosos sobre la estructura del suelo, la retención de agua y la profundidad radicular.

1.6.3. Propiedades y beneficios del uso del té de compost

Como hemos comentado anteriormente, muchos estudios han analizado la capacidad del té de compost para la supresión de enfermedades (Cronin et al., 1996, Koné et al., 2010, St. Martin et al., 2012), llegándose a demostrar que el uso de NCT se muestra como una herramienta viable para la supresión de patógenos. Los mecanismos relacionados con el té compost no aireado están basados en resistencias inducidas, antibiosis y mecanismos de competición que suprimen a patógenos foliares.

Por otro lado, y para el caso de compost aireado (ACT), los efectos han sido muy variables dependiendo de los cultivos a tratar, obteniéndose niveles de supresión de patógenos y de rendimientos agrícolas muy diferentes.

Considerando la diversidad de la comunidad microbiana del té de compost, es probable que múltiples modos de actividad asociados con el antagonismo microbiano estén envueltos en la supresión de enfermedades.

El té de compost contiene un set de microorganismos aeróbicos que realizan una serie de funciones beneficiosas para el desarrollo de las plantas:

Consumen exudados de las plantas (raíces y hojas), no dejando sustrato para el desarrollo de microorganismos que causan enfermedades.

Ocupan los sitios de infección, así incluso si hay presencia de microorganismos fitopatógenos, estos no logran penetrar los tejidos.

Producen componentes y metabolitos que inhiben la actividad y crecimientos de microorganismos fitopatógenos (Martin Riegel, 2008).

Por otro lado, se ha observado que el té de compost proporciona múltiples beneficios cuando se aplica en forma de fertilizante ya que mejora la nutrición de las plantas y de los microorganismos beneficiosos debido a que:

Los nutrientes solubles en el té permiten que los microorganismos crezcan más rápido y puedan suprimir enfermedades más rápidamente.

Los nutrientes solubles del té nutren a las plantas, haciéndolas más saludables y capaces de generar más exudados asimilables. Permite la detoxificación del suelo y el agua, haciendo más fácil el crecimiento de las plantas.

1.6.4. Limitaciones en el uso a ambiental del té de compost

Según ciertos autores, existen algunos posibles aspectos negativos derivados del uso de compost inmaduro para elaborar té de compost, lo que puede afectar al crecimiento y provocar daños en los cultivos consecuencia de efectos fitotóxicos (Keeling et al., 1994). Es necesario tener en cuenta además, que la composición del compost a partir del cual se obtiene el té difiere en función del origen de la materia prima (García Izquierdo, 2011), por lo que existe el peligro de posibles daños a las plantas inhibiendo su crecimiento, e incluso provocando su muerte. Es por ello, que la calidad del compost a emplear en la elaboración del té es muy importante.

El riego del suelo con té de compost puede provocar un impacto ambiental negativo si no se emplea de manera adecuada, debido a la presencia de compuestos tóxicos. Principalmente caben destacar los posibles efectos perjudiciales derivados de la presencia en el té de compost de:

Metales Pesados: los metales pesados pueden formar parte de la composición de los lodos utilizados en el compostaje y por tanto pueden formar parte del té de compost. La importancia de éstos viene dada por su posible acumulación en el suelo y su absorción y almacenamiento en los tejidos de las plantas, quedando así incluidos en la cadena alimentaria de los animales y del ser humano.

Microorganismos patógenos: El acondicionamiento de los lodos obtenidos en las depuradoras de aguas residuales a través de técnicas como el compostaje, permite controlar y eliminar el riesgo de contaminación por patógenos. Sin embargo, un proceso de compostaje incorrecto puede llevar a la existencia de virus y bacterias entre otros, en el té de compost obtenido a partir de tales lodos. Desde el punto de vista agrícola es un factor importante a tener en cuenta, puesto que es interesante conocer la cantidad de microorganismos y su capacidad de supervivencia, con el fin de prever las posibles contaminaciones por ingestión de partes comestibles de plantas que hayan podido estar en contacto con un té de compost inapropiado (García Izquierdo, 2011).

Exceso o defecto de nutrientes: La aplicación de té de compost al suelo puede producir una competencia por determinados nutrientes entre los microorganismos y las plantas, además de una posible lixiviación de los nitratos hacia los acuíferos.

Alta concentración de sales: Los residuos urbanos, especialmente si han sido compostados, pueden presentar un elevado contenido de sales, lo que puede influir provocando salinización y afectando negativamente sobre el sistema suelo-planta al ser utilizadas como enmiendas del suelo: ya que disminuye la capacidad de germinación de las semillas, inhibe el crecimiento de las plantas y puede empeorar la estructura del suelo

1.6.5. Problemática ambiental asociada a la presencia de metales pesados en el té de compost de lodo de depuradora

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los

metales alcalinos y alcalinotérreos). Se clasifican dentro de los contaminantes químicos inorgánicos y se pueden presentar en forma iónica o molecular. Se distinguen dos grupos:

Con funciones biológicas conocidas. Aquí se incluyen los necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Citaremos el As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.

Sin función biológica conocida. Son un grupo altamente tóxicos, destacando el Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi.

El contenido en metales pesados, desde el punto de vista comercial juegan un papel importante en la calificación de un compost y desde el punto de vista ambiental, es el factor más limitante y el más necesario de controlar. El compost de lodos de depuradora puede presentar contenido apreciable en metales pesados ocasionando restricciones en la calidad final del producto ya que estos elementos son no biodegradables y pueden ser peligrosos para la salud humana porque a través del suelo pueden ser captados por las plantas y entrar de esta forma en la cadena trófica pudiendo provocar diferentes grados de toxicidad en humanos, animales y plantas o bien contribuir a la contaminación de los suelos (Paradelo et al, 2007).

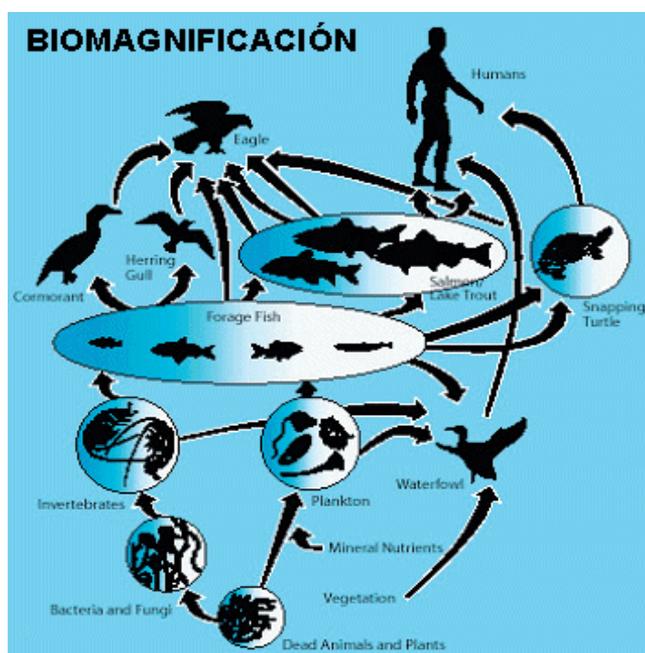


Figura 8.- Esquema del proceso de biomagnificación

Como consecuencia de la actividad humana y especialmente la industrial, los metales pesados están presentes en muchos lodos generados en las estaciones depuradoras de aguas residuales. Muchos de los metales que tienen una densidad alta no son especialmente tóxicos y algunos son elementos esenciales en el ser humano, independientemente de que a determinadas concentraciones puedan ser tóxicos en alguna de sus formas. Sin embargo, hay una serie de elementos que pueden representar un serio problema medioambiental debido a la alta peligrosidad como es el caso de los metales pesados al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, principalmente debido a la actividad industrial y minera, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años, contaminando el suelo y acumulándose en las plantas y los tejidos orgánicos generando biomagnificación en los seres vivos como consecuencia de su entrada en la cadena trófica.

Los metales pesados pasan del suelo a las plantas, y de ahí a los mamíferos. El problema esencial es que debido a la semejanza entre muchos contaminantes y los elementos traza esenciales, las células pueden incorporar elementos tóxicos que quedan dentro de ellas o incorporados en su membrana causando un daño letal. En humanos, en general, crean problemas en los tejidos reproductivos y en el desarrollo, de tal manera que existe un riesgo de exposición en útero (teratógenos) y primeros años de vida (acumulación) aunque depende del tipo de metal pesado que consideremos. Es necesario optimizar al máximo los sistemas de gestión de los residuos para evitar la presencia de metales pesados, puesto que de otra manera será imposible alcanzar niveles de calidad que permitan la aplicación agrícola de los residuos orgánicos.

La presencia de metales pesados en el compost es totalmente inherente a los residuos empleados en el proceso de compostaje. La calidad del compost en este aspecto comienza por los materiales de entrada en la planta de compostaje. En el momento que el contaminante entra en el compost el proceso no podrá sino concentrarlo. La solución a este problema pasa necesariamente por un sistema de recogida selectiva de los residuos y evitar contaminaciones en las propias plantas. La norma

propuesta por el CEN para la determinación de metales pesados (UNE-EN 13652:2002) se basa en una extracción de los elementos solubles en agua regia.

El Real Decreto de fertilizantes (RD 824/2005) establece tres clases de compost por su contenido en metales pesados (Cd Cu, Ni, Pb, Zn, Hg y Cr), limitando para el caso menos exigente una aplicación máxima al suelo de 5 toneladas de compost por hectárea y año.

Por otro lado, según el contenido en metales pesados también permite estimar la posibilidad de aplicar estos lodos, una vez compostados y estabilizados, como enmienda agrícola, según el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario.

Existen muchos tipos y calidades de compost disponibles en el mercado, por lo que el agricultor deberá conocer en todo momento la riqueza en materia orgánica y elementos fertilizantes que presentan con el fin de ajustar correctamente sus programas de abonado, así como su contenido en metales pesados y microorganismos patógenos, de manera que se minimicen los posibles riesgos sobre el medio ambiente y la salud humana. Según la legislación vigente sobre fertilizantes y afines (Orden del MAPA de Orden de 2 de noviembre de 1999 por la que se modifica la Orden de 28 de mayo de 1998, sobre fertilizantes y afines.), el compost debe contener como máximo las concentraciones de metales pesados que se detallan en la Tabla 5:

Tabla 5.-Concentraciones máximas de metales pesados permitidas en el compost (mg/kg)

Metales pesados (mg/kg)						
Cadmio	Cobre	Níquel	Plomo	Zinc	Mercurio	Cromo
10	450	120	300	1100	7	400

En el caso de que el compost haya sido elaborado a partir de mezclas conteniendo más de un 35% peso/peso de lodos de depuradora, será de aplicación la legislación vigente sobre utilización agrícola de lodos

de depuración (R.D. 1310/1990 de 29 de octubre) y las concentraciones máximas de metales pesados permitidas en el compost son las siguientes:

Tabla 6.- Concentraciones máximas (ppm) de metales pesados permitidas en el compost elaborado con más de 35% peso/peso de lodos de depuradora

	Metales pesados (ppm)						
	Cadmio	Cobre	Níquel	Plomo	Zinc	Mercurio	Cromo
Suelos ácidos	20	1000	300	750	2500	16	1000
Suelos básicos	40	1750	400	1200	4000	25	1500

Así mismo, previamente a la aplicación del compost se deberán determinar los niveles de metales pesados en suelo y verificar que se encuentran por debajo de los siguientes límites:

Tabla 7.- Concentraciones máximas (ppm) de metales pesados permitidas en los suelos para su uso agrícola

	Metales pesados (ppm)						
	Cadmio	Cobre	Níquel	Plomo	Zinc	Mercurio	Cromo
Suelos ácidos	1	50	30	50	150	1	100
Suelos básicos	3	210	112	300	450	1.5	150

La toxicidad causada por estos metales afecta a todos los índices de la actividad microbiana tales como: productividad primaria, fijación de nitrógeno atmosférico, ciclos biogeoquímicos, síntesis y actividades enzimáticas y a la descomposición de la materia orgánica, sin olvidar que el pH del suelo es determinante en la solubilidad de los metales y por tanto en su disponibilidad.

Hasta la fecha, numerosos métodos físico-químicos se han utilizado para eliminar los metales pesados del medio ambiente. La precipitación química y el intercambio iónico son los más utilizados, pero la oxidación / reducción, filtración, tratamiento electroquímico, ósmosis inversa, la

tecnología de membranas y la recuperación de la evaporación también son comunes (Sarabjeet y Dinesh, 2005). Sin embargo, si la concentración es demasiado baja, estas técnicas tienen un coste excesivo y no son eficientes (Vullo et al., 2007). Para resolver este problema, se han probado algunos procesos biológicos. La biosorción es el proceso por el que algunos organismos, tales como plantas, bacterias, hongos o algas, se utilizan para eliminar los contaminantes ambientales. Es ampliamente conocido que los microorganismos pueden tolerar y sobrevivir en condiciones extremas ya que se han encontrado en zonas donde los valores de temperatura, salinidad o pH no permiten la existencia de la vida (Vijayaraghavan y Yeung-Sang, 2008; Wang y Chen, 2008; Muñoz et al., 2012). Cuando los microorganismos se encuentran bajo condiciones de estrés, como vivir en un ambiente contaminado con metales pesados, se desarrollan mecanismos de supervivencia siendo algunos de ellos capaces de eliminar los metales pesados y otros contaminantes del medio ambiente. Esto significa que los microorganismos pueden ser utilizados como una herramienta de biorremediación barata y eficiente (Muñoz et al., 2012). Los procesos implicados en la desintoxicación por metales pesados incluyen la absorción, adsorción, intercambio iónico, formación de complejos de superficie y la precipitación (Fomina y Gadd, 2014).

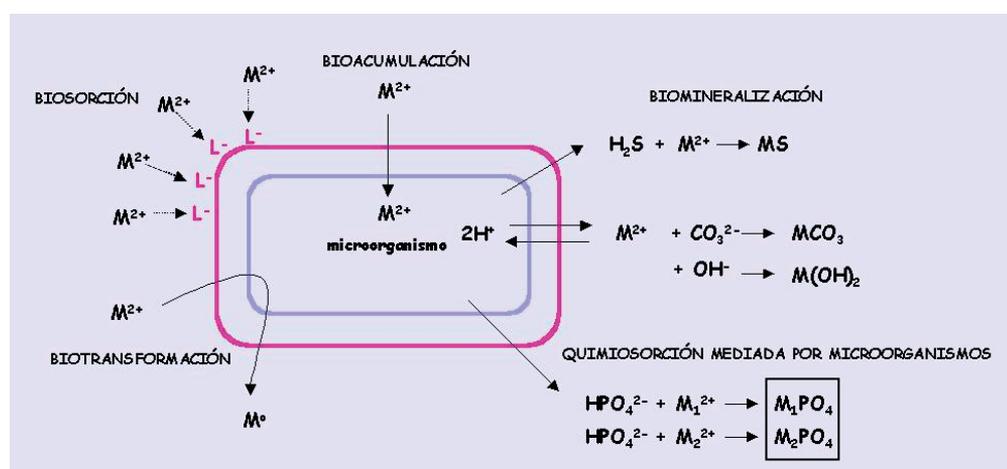


Figura 9.- Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos

La elevada diversidad, cantidad y actividad de los microorganismos presentes en el compost y té de compost favorecen el desarrollo de actividades microbianas específicas que conducen a la eliminación o a la reducción del poder contaminante de tales compuestos lo que reduce su biodisponibilidad y, consecuentemente, su toxicidad.

2. SUELOS

El suelo es un sistema dinámico, complejo, abierto, vivo y frágil que constituye uno de los factores más importantes en el equilibrio global de la biosfera por lo que debe ser protegido para garantizar su estabilidad (Porta et al. 2004)

Un suelo ideal contiene cuatro componentes en proporciones bien definidas: material mineral (45%), materia orgánica (5%), aire (25%) y agua (25%). El suelo está constituido en su mayoría por materiales minerales, producto de la descomposición de la roca madre de la corteza terrestre y el factor biótico, es decir, las plantas, los animales y en general la materia orgánica que cae en la superficie y entra en contacto con seres microscópicos. De esta forma, y en complicidad con el tiempo (mucho tiempo), es como se forma el suelo que todos conocemos.

El suelo es un sistema complejo que tiene la capacidad de desarrollar diversas funciones (Cerda, 2007)

Suelo como reciclador de la materia orgánica: es un perfecto intercambiador de materia entre la parte biótica y abiótica. Bacterias e insectos se encargan de desintegrar la materia orgánica y mezclarla con las partículas minerales para después ser aprovechado por las plantas.

Suelo como fijador de CO₂: la materia orgánica del suelo es fruto de la acumulación de carbono, por tanto cuando aumenta el contenido de materia orgánica del suelo estamos secuestrando un pool de CO₂.

Suelo como reserva de agua: un suelo en buen estado es capaz de retener agua de lluvia evitando así los procesos de escorrentía y los riesgos derivados de dicho fenómeno. Es capaz además de actuar como un quimiobiofiltro para la limpieza del agua que percola.

El suelo como base de la vida: el suelo proporciona los alimentos necesarios para toda clase de seres vivos así como para el hombre. Es el sustento de los vegetales, primer escalón en la cadena trófica

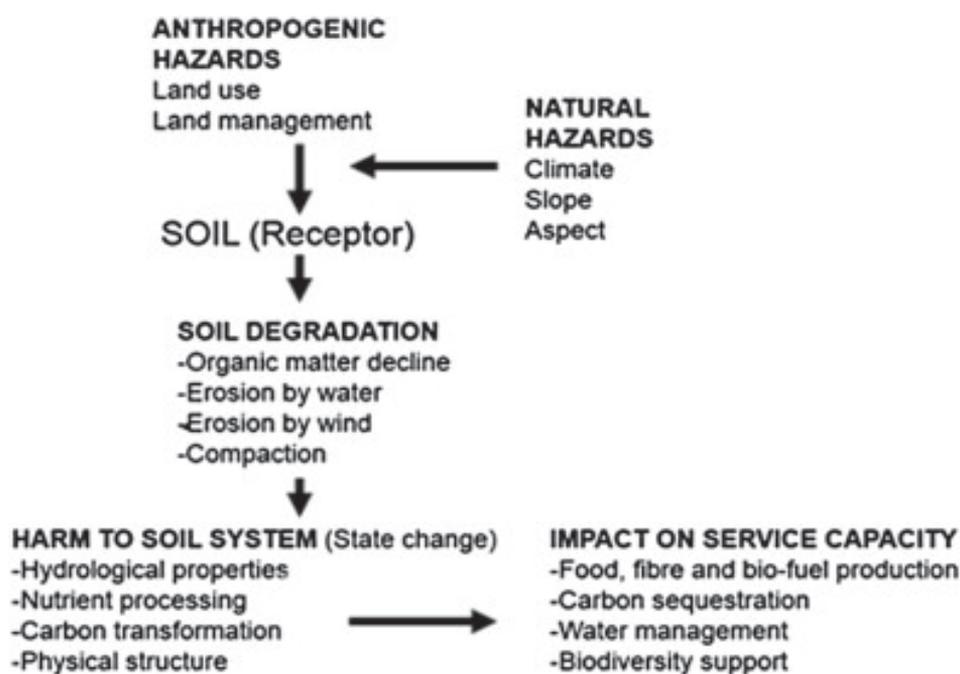


Figura 10.-Relaciones entre las amenazas antropogénicas para el suelo, los riesgos naturales, los procesos de degradación y el daño al suelo y los servicios que ofrece.

No obstante a pesar de ser un elemento esencial para el buen funcionamiento de cualquier ecosistema y el mantenimiento de la vida está sometido a diversos peligros. El riesgo de daño al suelo surge de su exposición a los elementos que pueden causar su degradación. Estos peligros, que se detallan en la figura 11, son tanto de origen natural

(pendiente, lluvia, viento...) como antropogénicos (labranza...) que entre otras consecuencias, dañan la capacidad del sistema del suelo para proporcionar servicios con valor económico (Kimbblewhite et al., 2013).

El proceso de degradación es el resultado de una serie de cambios físicos, químicos y biológicos que conducen a la reducción de la calidad edáfica. Estos procesos son numerosos y en general, producto del mal uso que el hombre realiza de los recursos edáficos. Seguidamente, abordaremos la descripción de los más relevantes:

Pérdida de materia orgánica: ocurre como consecuencia del empobrecimiento del sustrato vegetal por sobreexplotación o monocultivo, lo que trae como consecuencia la baja fertilidad y productividad de los suelos.

Salinización y sodificación: se trata de los procesos que tienen lugar al aumentar el contenido de sales potásicas y sódicas del suelo, en detrimento de otros cationes, que como el calcio, son vitales para la nutrición vegetal. Bajo estas circunstancias, el pH del suelo aumenta en exceso (por encima de 8.5), generándose una captura muy descompensada de los nutrientes que requieren las plantas. Si la salinización no es muy acusada puede revertirse, haciendo uso de la ingeniería hidráulica o abonados específicos.

Acidificación: La acidificación es también un proceso que genera la descompensación del balance de nutrientes, como la salinización. En el caso de la acidificación, la mayor parte de los nutrientes son lavados del suelo por el agua, siendo sustituidos por el hidrógeno. Así el pH de los suelos desciende de 4.5 (muy ácidos), y la pobreza de nutrientes merma la producción de la

Compactación: Se trata de la pérdida de la estructura del suelo, el suelo pierde espacio poroso y volumen tornándose más denso y pesado.

Contaminación: Este sería el resultado de un abonado excesivo que induce la acumulación de nitratos y fosfatos, entre otros compuestos, o del uso indiscriminado de plaguicidas, y otros compuestos elaborados sintéticamente por el hombre.



Figura 11.-Terreno altamente erosionado

Los procesos erosivos se caracterizan por ser recurrentes, intermitentes, lentos progresivos e irreversibles (Morgan, 1986). La erosión es uno de los factores determinantes del avance de la desertificación en España y constituye un problema ambiental de especial relevancia en la mayor parte del área mediterránea. Según el Mapa de Estados Erosivos del Suelo (MMA, 1987-2001), el proceso de formación de suelo alcanza un ritmo variable entre 2 y 12 toneladas por hectárea y año. Sin embargo, el 24% del territorio nacional (12.382.984 ha) pierde más de 12 toneladas

anuales por hectárea y el 12,3% (6.217.830 ha) a un ritmo superior a las 50 toneladas por hectárea y año. Estos seis millones de hectáreas con procesos erosivos graves se sitúan en su mayoría dentro de las cuencas hidrográficas de clima mediterráneo-continental, principalmente en las cuencas del Sur, Guadalquivir, Ebro, Tajo y Júcar. La pérdida anual de suelo en España se valora en más de 1.200 millones de toneladas. El 27% de estas pérdidas se producen en superficie forestal (334 millones de toneladas), correspondiendo al ámbito agrícola el resto (887 millones de toneladas).

Teniendo en cuenta la situación y las amenazas continuadas a la calidad del sistema suelo, se hace necesaria una búsqueda de técnicas que puedan hacer recuperar (restauración) las funciones de los suelos, a través de la creación y mantenimiento de masas forestales (forestal). Para ello, en 2001, se redactó el *Plan Nacional de Actuaciones Prioritarias en materia de Restauración Hidrológico-Forestal* que comprende el conjunto de actuaciones necesarias para proteger el suelo frente a la erosión, defender el territorio frente a la sequía y las inundaciones, aumentar la capacidad de aprovisionamiento de agua y contribuir a la conservación y mejora de la funcionalidad de los suelos.

Las técnicas de restauración hidrológico-forestal se basan en los fundamentos de la hidrología forestal, considerada como especialidad de la hidrología que estudia la relación entre el agua y el suelo, dentro del marco de trabajo que constituyen los bosques y montes, y consisten principalmente en la implantación de cubiertas vegetales, en la ejecución de hidrotecnias y en la realización de tratamientos silvícolas orientados a la mejora de la funcionalidad ecológica de los bosques, con especial atención a la protección y formación de suelo.

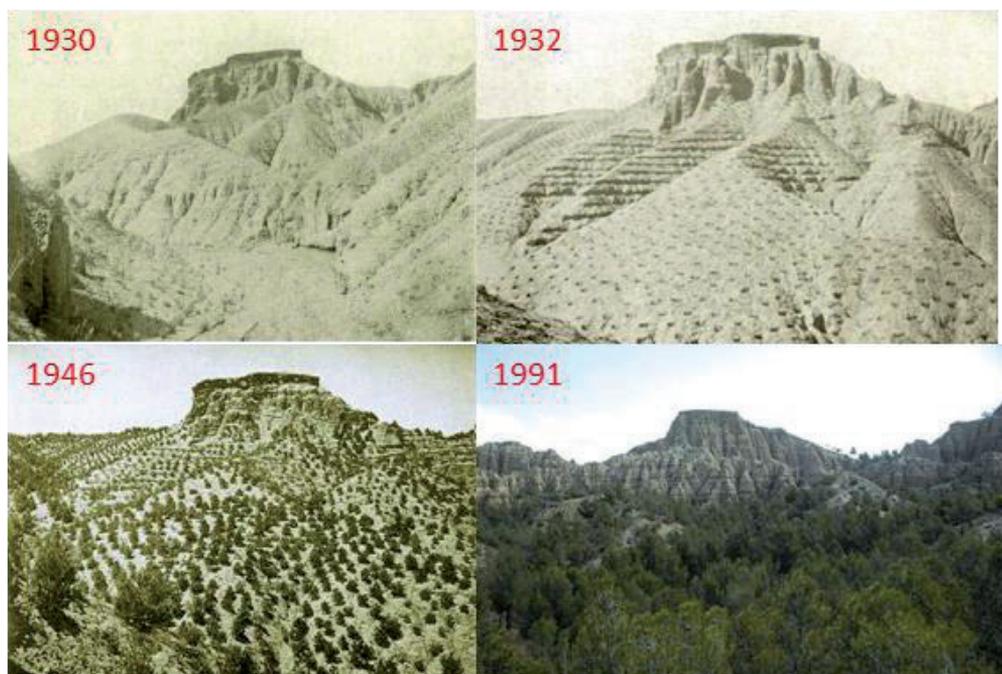


Figura 12.- Evolución de la restauración de El Torreón, Esfiliana, Granada.

2. 1. Agricultura y Suelos de olivar

La agricultura es el conjunto de técnicas y conocimientos para cultivar la tierra. Engloba los diferentes tratamientos del suelo y los cultivos de vegetales y comprende todo un conjunto de acciones que transforma el medio natural.

El inicio de la agricultura se encuentra en el período Neolítico y su desarrollo se gestó en varias culturas que la practicaron de forma independiente. Esta práctica ha seguido realizándose de diversas maneras hasta nuestros días. Las primeras culturas usaban técnicas muy rudimentarias que se fueron desarrollando desembocando en las innovaciones tecnológicas que conocemos y disfrutamos en la actualidad. Es a finales del s. XIX cuando el uso de abonos químicos (fosfatos, nitratos, etc.) la mecanización y los estudios científicos de la edafología y la inge-

nería agrícola transformaron la agricultura, en una actividad similar a la industrial en cuanto a su conexión con la ciencia y tecnología. Todo esto provocó que la agricultura fuera evolucionando hacia una agricultura de mercado que produjo la cada vez mayor dependencia de los plaguicidas y el abonado intensivo, con graves problemas medioambientales como la contaminación de suelos y acuíferos y una drástica reducción de la biodiversidad (Mazoyer y Roudart 2006).

En la zona Mediterránea uno de los usos del suelo derivado de la agricultura con impactos particulares en la erosión del mismo, es el abandono de tierras agrícolas que se observa muy a menudo en zonas montañosas marginales o semi-montañosas y de difícil acceso, donde la agricultura era hasta hace pocos años tradicional o semi-tradicional con bajos insumos y alta intensidad de mano de obra humana (Loumou y Giourga, 2002).

El cultivo del olivo es un ejemplo típico del cultivo extensivo tradicional que se desarrolló en las zonas marginales. Dentro del territorio nacional, la distribución de olivar por Comunidades Autónomas se concentra sobre todo en el Este, Sur y Suroeste peninsular. Destaca por su importancia Andalucía donde se concentra el 60,2% de la superficie nacional lo que equivale a 1,5 millones de hectáreas. Le siguen en importancia Castilla la Mancha (15,7%) y Extremadura (10,4%). El resto de Comunidades Autónomas suman el 13,7% de la superficie nacional de olivar. Dentro de Andalucía la mayor parte de olivar se ubica en Jaén donde el 43,41% de su superficie provincial está ocupada por este cultivo. Le siguen Córdoba, Málaga y Granada con más del 15% de su superficie provincia ocupada por olivos, y muy próxima al 15% también está Sevilla (MAGRAMA 2012)

2.2. Enmiendas del suelo

La enmienda es el aporte de un producto fertilizante o de materiales destinados a mejorar la calidad de los suelos.

Las enmiendas se hacen necesarias tras un laboreo intensivo del suelo o cuando éste se encuentra en un estado grave de deforestación. En estos supuestos se requiere la intervención humana para recuperar la productividad (Parr et al. 1990).

No obstante, la aparición de nuevas técnicas agrícolas como la rotación de cultivos y el uso de enmiendas aumentan en lugar de disminuir la cantidad de carbono orgánico en el suelo (Bronik y Lal, 2005).

Las categorías de enmiendas del suelo son amplias, y pueden incluir enmiendas orgánicas para cambiar la textura del suelo, fertilizantes para aumentar la estructura de nutrientes, los cultivos de cobertura para agregar aireación y drenaje o incluso artículos que van a cambiar el pH del suelo

Las enmiendas orgánicas, de especial importancia en este proyecto, son residuos de origen animal y vegetal que adicionados a los suelos mejoran sus características químicas, físicas y biológicas. Las fuentes potenciales como abonos orgánicos se pueden dividir de la siguiente forma:

Estiércoles: constituidos por los desechos digestivos de los animales que se encuentran en la finca. En general el estiércol consta de dos componentes originales: sólidos y líquido en una proporción de 3 a 1. La parte sólida aporta la mitad del N, todo el fósforo y 2/5 del potasio.

Residuos de cosecha: desechos orgánicos que genera el cultivo luego de su cosecha, tales como tallos, hojas raíces u otros órganos; de igual manera los que el mismo aporta luego de su proceso.

Abonos verdes: son cultivos de cobertura, cuya finalidad es devolverle a través de ellos sus nutrimentos al suelo. Se hacen

mediante siembras de plantas, generalmente leguminosas, solas o en asocio con cereales.

Biofertilizantes: preparados que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas eficientes fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo o potenciadoras de diversos nutrientes, que se utilizan para aplicar a las semillas o al suelo, con el objetivo de incrementar el número de estos microorganismos en el medio y acelerar los procesos microbianos.

Efluentes y lodos: subproductos de la biodigestión de estiércoles en condiciones anaerobias. El Efluente es el material líquido procedente del biodigestor como producto ya “tratado” y lodo está constituido por los sedimentos que se acumulan.

Compost y abono líquido: abono orgánico resultante de la mezcla y posterior descomposición de materiales biodegradables de origen animal y vegetal.

2.3. Uso de microcosmos edáficos para la determinación del efecto de enmiendas

Los microcosmos son sistemas que han sido utilizados ampliamente por numerosos autores (Kelly et al. 1999, Sabate et al. 2006, Viti et al. 2007) para estudiar bajo condiciones controladas en el laboratorio la evolución de diversos parámetros edáficos. Un microcosmos es un modelo físico simplificado, de un ecosistema que permite experimentos controlados que se realizarán en el laboratorio o in situ.

Los microcosmos edáficos son herramientas apropiadas para evaluar los efectos de diferentes condiciones ambientales (temperatura, humedad, atmósfera...) en el suelo. Este tipo de enfoque hace posible establecer con mayor firmeza la relación causal entre una variable biótica o abiótica y sus efectos en el suelo y sus comunidades en particular los

microorganismos, ya que representan una clave importante para comprender el impacto de los factores ambientales y antropogénicos en los ecosistemas (Caracciolo et al. 2013).

Los microcosmos se han utilizado en casi todas las áreas de la ecología terrestre y acuática. Han sido utilizados como una herramienta de enseñanza en el aula trayendo aspectos de la naturaleza al laboratorio.

Los primeros experimentos ecológicos que utilizaron microcosmos parecen ser los de LL Woodruff en 1912, sin embargo, la mayoría de la investigación con microcosmos se ha llevado a cabo desde 1960. El uso temprano de microcosmos por los ecologistas prominentes incluyendo GF Gause, HT Odum, R. Margalef, RH Whittaker, RJ Beyers, GD Cooke, y EP Odum ha contribuido al desarrollo de conceptos importantes en la ecología, incluyendo el principio de exclusión competitiva, la sucesión, la auto-organización, y el principio de la máxima potencia.

En los últimos tiempos, se han convertido también en herramientas populares para estudiar el destino y los efectos de los contaminantes (por ejemplo, metales pesados), los pesticidas y herbicidas, los factores de estrés (por ejemplo, altas temperaturas), compuestos nuevos, y organismos genéticamente modificados.

Cuando un microcosmos está diseñado para representar un modelo de un sistema que ya existe, debe contener todos los rasgos característicos de dicho ecosistema. Por lo general se recomienda que los componentes utilizados en el microcosmos (por ejemplo, suelo, agua, plantas, animales) se obtengan de los ecosistemas naturales. El tamaño de los microcosmos afecta a la cantidad de diversidad que el sistema puede acomodar así, los microcosmos más grandes son capaces de soportar una mayor diversidad y más niveles tróficos que los pequeños. La forma del microcosmos también tiene el potencial de impactar fuertemente en su funcionamiento. El material de la pared debe ser inerte y no lixiviar o absorber sustancias que pueden afectar el experimento. Los gases tales como el oxígeno deben poder difundirse a través de los plásticos. También se debe tener en cuenta los efectos del aislamiento artificial, que

restringe el movimiento de organismos móviles aunque por lo general los microcosmos de pequeño tamaño también excluye los niveles tróficos superiores.

El diseño de un microcosmos o cualquier modelo de un ecosistema natural es una prueba en sí misma de lo mucho que se sabe sobre el ecosistema. Un estudio que utilice microcosmos debe incluir la medición de las características y funciones bióticas y abióticas. La selección de características y funciones medidas debe estar basada en lo importante que son éstas para el ecosistema natural. Estas mediciones permiten un seguimiento del microcosmos que representa el ecosistema natural. No obstante, los resultados de los estudios de microcosmos deben confirmarse con pruebas adicionales a escala de campo (Matheson, 2008).

En un estudio anterior llevado a cabo con el compost empleado para la obtención del té (Pérez-Lomas, 2009), se usaron estos sistemas de microcosmos para valorizar el co-compost derivado de lodos de depuración de aguas residuales en condiciones similares a las empleadas en este estudio obteniéndose los siguientes resultados:

Los microcosmos resultaron ser un mecanismo experimental eficaz para el estudio de los parámetros de interés ya que permite el control de las condiciones de trabajo.

De todas las variables estudiadas, el factor suelo (4 estudiados) resultó ser el de mayor influjo.

La enmienda con el co-compost proporciona al suelo diferentes compuestos físico-químicos y nutrientes que afectan positivamente a la estructura del mismo así como a la actividad biológica

La temperatura y el tiempo de incubación de los microcosmos provoca una serie de cambios en las propiedades físico-químicas y biológicas estudiadas.

El co-compost utilizado, clasificado como B, tiene un contenido en metales pesados por debajo del límite máximo por lo que posibilita su aplicación como fertilizante.

3. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN EL TÉ DE COMPOST Y EN LOS SUELOS

Para una mejor comprensión del efecto que la adición del té de compost o el compost provocan sobre un suelo al que se le añade alguno de estos productos como biofertilizantes, es necesario conocer las comunidades microbianas presentes. Así pues es interesante describir los métodos analíticos para evaluar la diversidad microbiana.

3.1. Recuento en placa

Tradicionalmente, el estudio de las comunidades microbianas de una muestra ambiental se ha determinado usando la técnica de recuento en placa. Para ello se usan diferentes medios de cultivo cuya composición nutricional varía obteniéndose así distintos grupos microbianos. Con este sistema, se trata de conocer el número total de microorganismos presentes en un sistema cualquiera.

Dependiendo de las características del medio utilizado (medio rico, medio limitado en nutrientes, etc) y de las condiciones de incubación (mesófilos, psicrófilos) los microorganismos analizados serán miembros de poblaciones diferentes.

No obstante, es sabido que son un mínima parte de la microbiota total de un sistema es capaz de crecer en un medio de cultivo por lo que los resultados mostrarán un gran sesgo respecto a la población total (Dees y Ghiorse 2001).



Figura 14.- Colonias bacterianas en placas con medio de cultivo

3.2. Actividades enzimáticas

La estimación de los microorganismos contenidos en una muestra puede llevarse a cabo a través del estudio de las funciones que éstos realizan. Así pues, la actividad biológica desarrollada por la microbiota de un suelo está directamente relacionada con los procesos metabólicos que ocurran en las distintas comunidades. Entre los distintos parámetros que se pueden analizar están la cantidad de O_2 consumido o CO_2 producido o las actividades enzimáticas entre otros muchos.

Para realizar una aproximación al entendimiento de los ciclos de los nutrientes y a los niveles de actividad microbiana responsables de los procesos que tienen lugar en los suelos, se investigan varias actividades enzimáticas de estos, ya que dan cuenta de las reacciones bioquímicas que suceden dentro de este heterogéneo y complejo sistema; además, están estrechamente relacionadas con las propiedades físicas, químicas y biológicas y son sensibles a los cambios generados por manejo. Por ende las actividades enzimáticas permiten monitorear el funcionamiento del suelo respondiendo a la necesidad de entender los efectos positivos, negativos e interactivos sobre las propiedades y los procesos que suceden dentro de esta matriz y las relaciones entre estos factores, los usos y prácticas de manejo, entre las cuales se enmarca la aplicación de extractos líquidos obtenidos a partir del compost.

En el suelo se ha detectado la actividad de hidrolasas, transferasas, oxidorreductasas y liasas que están directamente relacionadas con los ciclos del C, N, P y S (Cerón Rincón. et al, 2005).

A nivel más simple, cuando investigamos la actividad enzimática en el suelo, se debe desarrollar una evaluación para esa enzima. Esto significa que se debe añadir una cantidad conocida de suelo a una solución que contiene una concentración conocida de las especies del sustrato y determinar la velocidad a la que el sustrato es convertido en producto bajo condiciones cuidadosamente controladas de temperatura, pH, fuerza iónica, etc. Antes de que la evaluación sea realizada, uno

debe conocer: 1) la reacción catalizada con detalles estequiométricos; 2) las especies, además del sustrato, que deben estar presentes; 3) la dependencia cinética de la reacción de dichas especies requeridas; 4) las condiciones óptimas de temperatura, pH, fuerza iónica; y 5) los medios adecuados para monitorizar la desaparición del sustrato o la aparición de productos.

3.3. Estudio del ADN

En la inmensa mayoría de los estudios realizados que usan técnicas moleculares se trabaja con el gen 16 que codifica el gen RNA ribosomal 16 S (θ 16S rRNA). El motivo es que este gen presenta una serie de características que lo hacen idóneo como marcador molecular: 1) Estar presente y tiene la misma función en todos los organismos, 2) La secuencia de nucleótidos de la que se compone contiene regiones altamente conservadas, es decir, comunes en todos los microorganismos y regiones hipervariables que permiten identificar el taxón al que pertenece el gen y 3) Su transmisión es principalmente vertical lo que permite establecer relaciones filogenéticas.

En este contexto, tras la extracción del ADN es esencial ejecutar la técnica de PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

Para un análisis cualitativo existen la técnica del **DGGE (electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización,)** o **TGGE (electroforesis en gel con gradiente de temperatura)**. Ambas son formas de electroforesis para desnaturalizar la muestra mientras se mueve a través de un gel de acrilamida. Los fragmentos de ADN de doble hebra de la misma

longitud pero diferente composición de bases se pueden separar en un gel de poliacrilamida, que tiene un gradiente lineal de productos químicos de desnaturalización: urea y formamida (DGGE) o de temperatura (TGGE). Los fragmentos de ADN migran en el gel hasta que se desnaturalizan parcialmente.

El número de fragmentos en el gel de DGGE o TGGE indica la diversidad en la comunidad microbiana.

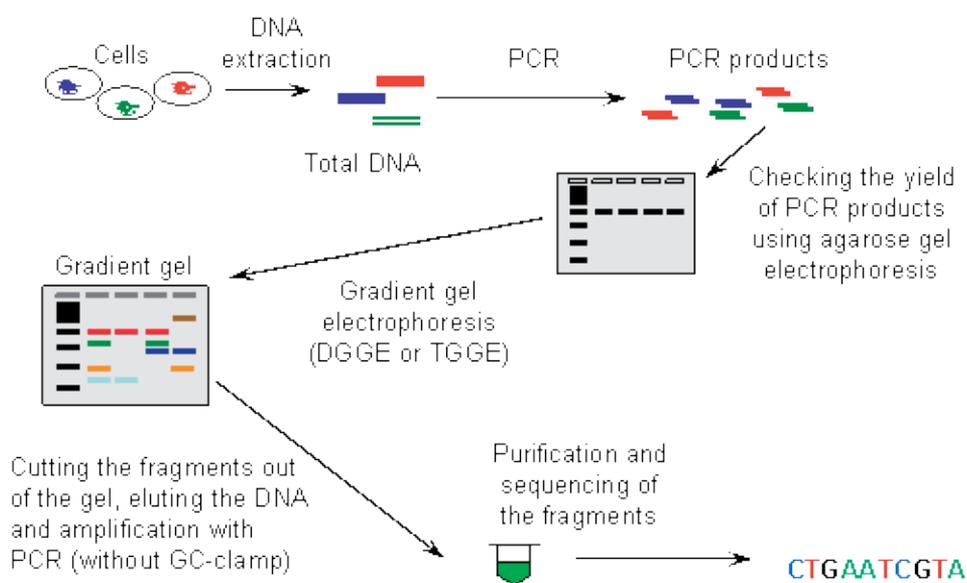


Figura 15.-Pasos para un análisis por DGGE o TGGE

Actualmente, existe una variante de la PCR llamada **PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)** utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable; a

dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo (generalmente SYBR Green) que ve multiplicada su cantidad con cada ciclo produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real.

La cuantificación puede realizarse en términos absolutos o relativos. En el primer caso, que es el utilizado en este estudio, la estrategia es relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN empleando una curva de calibrado; para este enfoque es vital que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta de calibrado posean una misma eficiencia de amplificación.



Objetivos

La necesidad de preservar el medio ambiente libre de contaminación exige una depuración de las aguas residuales urbanas/domésticas antes de ser vertidas a los cauces receptores. En este proceso de depuración se generan elevadas cantidades de lodos, los cuales pueden ser utilizados en agricultura, permitiéndose así el reciclado de la materia orgánica y elementos fertilizantes contenidos en ella. Entre las nuevas aplicaciones de estos biorresiduos a la agricultura y la jardinería destaca el uso del té de compost.

No obstante, la aplicación agrícola del té de compost se puede ver fuertemente limitada por una falta de conocimiento científico sobre los efectos colaterales (riesgos ecológicos) que su uso puede generar sobre los ecosistemas edáficos, los cuales resultan especialmente sensibles en sus equilibrios microbianos y biogeoquímicos.

El té de compost se está aplicando con éxito como biofertilizante en países como EEUU, aunque el conocimiento y la aplicación de este producto son prácticamente inexistentes en España. Por tanto en el presente proyecto se pretende, como **objetivo principal**:

1. Elaborar un té de compost a partir de lodos de depuradora y establecer un protocolo del buen uso de este biofertilizante sobre suelos agrícolas para mejorar sus propiedades y aumentar su fertilidad. Se proyecta también encontrar y proponer las cantidades óptimas de dosificación de su aplicación.

Para ello se han desarrollado una serie de **objetivos parciales** que se detallan a continuación:

1. Optimizar del proceso de elaboración del té de compost, mediante análisis de la evolución en el tiempo y la adición de sustratos ricos en carbono.
2. Estudiar las distintas poblaciones microbianas presentes en el té de compost y su capacidad para tolerar y retirar y/o inmovilizar determinados metales pesados presentes en el té de compost.
3. Determinar el efecto de la aplicación del té de compost, en cuanto a dosis, patrón de aplicación, tiempo y temperatura de incubación, sobre la evolución de las propiedades de un suelo agrícola de olivar, mediante experimentos en microcosmos edáficos. Este objetivo se desarrolla en tres aspectos:
 - * Estudiar de la evolución de las propiedades fisicoquímicas del suelo.
 - * Evaluar la influencia que la adición de té de compost ejerce sobre la actividad microbiana del suelo.
 - * Estudiar el efecto que la adición de té de compost ejerce sobre la biodiversidad bacteriana del suelo, con especial atención a las poblaciones bacterianas implicadas en el ciclo del N y P.



Material y Métodos

El trabajo de investigación que se llevó a cabo en tres fases, tal y como se muestra en la Figura 16; una primera fase que pretendía establecer cuáles eran las condiciones óptimas para la elaboración del té de compost (tiempo de maceración, adición o no de fuente extra de carbono...).

La segunda fase se centró en averiguar si alguna o algunas de las poblaciones microbianas contenidas en el té de compost tenían la capacidad de tolerar la presencia de metales pesados, y en caso afirmativo identificarla y evaluar su potencial en biorremediación.

La tercera y última fase tiene como propósito testar la capacidad del té de compost como biofertilizante. Para ello se realizaron experimentos con microcosmos que contenían suelo de olivar y que se regaron con distintas cantidades de té de compost.

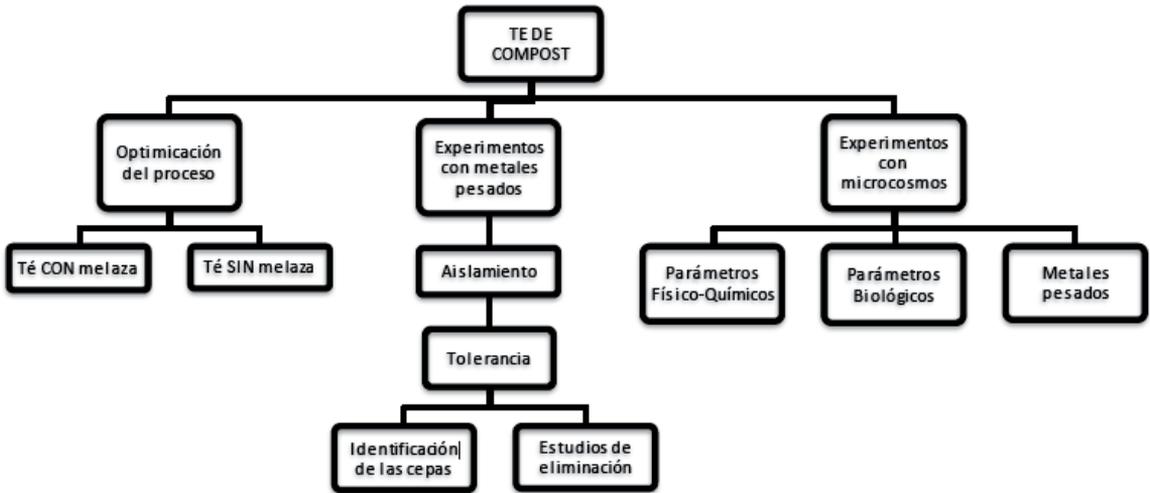


Figura 16.- Esquema general del trabajo realizado.

1. ELABORACIÓN DEL TÉ DE COMPOST: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y BIOLÓGICA DEL MISMO.

1.1. Descripción de la planta piloto

La elaboración del té de compost se realizó en una planta a escala piloto de 120 L de capacidad la cual es propiedad de la Universidad de Granada y cuyo esquema se puede apreciar en la Figura 17.

La planta, consta de un biorreactor cilíndrico y cerrado de 120 L de capacidad. En la parte superior el mismo, se sitúa un recipiente cilíndrico, en el que se introduce el compost, cuyas paredes están fabricadas de una malla metálica cuyo tamaño de poro es de 1,5 mm. En la parte inferior, se encuentra el sistema de aireación conectado a una bomba

peristáltica exterior, en nuestro caso, se mantiene una aireación constante a lo largo del proceso. Para controlar las condiciones de temperatura y oxigenación se instalaron además un termostato marca Aqua Medic y un oxímetro marca EcoScan DO6.

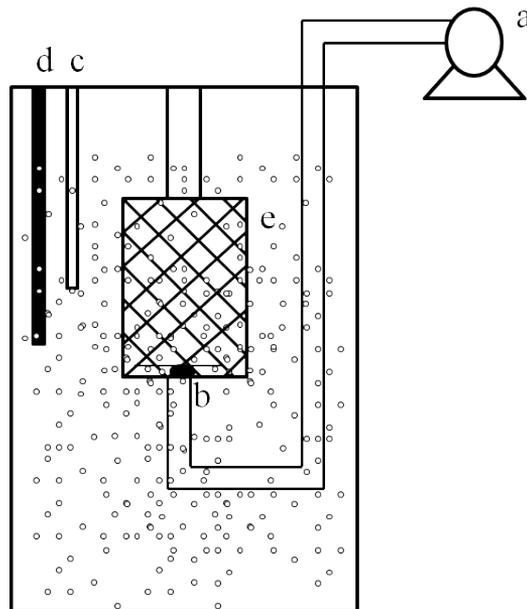


Figura 17.- Esquema de la planta a escala piloto utilizada para la producción del té de compost. (a) bomba de aireación, (b) difusor de aire, (c) oxímetro (EcoScan DO6), (d) termostato (Aqua Medic) (e) recipiente contenedor de compost (tamaño de poro de 1,5 mm)

1.2. Compost utilizado

La elaboración del té de compost utilizado en nuestro estudio se realizó a partir de un compost en cuya elaboración participo como material primario lodos de depuradora de agua residual urbana, Este compost, fue suministrado por la Empresa Biomasa del Guadalquivir S.L, la cual gestiona los lodos de depuradora generados por la empresa Municipal de Abastecimiento y Saneamiento de Granada, (EMASAGRA).

La caracterización físico-química de este compost se ha realizado en el Departamento de Edafología de la universidad de Granada por Pérez-Lomas. Las propiedades del compost utilizado se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7.- Propiedades físico-químicas del compost de lodos de depuradora

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor	
Humedad original (%)	13.3	NH ₄ ⁺ (ppm)	4612.5±643.6	
Humedad seco al aire (%)	8.5	NO ₃ ⁻ (ppm)	59.6± 7.8	
Nitrógeno (%)	2.2±0.1	NH ₄ /NO ₃	77.5	
Materia orgánica (%) ¹	27.28 ± 3.8	pH (H ₂ O) (1:2)	7.7	
Material orgánica (%) ²	35.29 ± 0.4	pH (CIK 0.1N) (1:2)	7.6	
C/N	7.18	Bases de cambio cmol ⁽⁺⁾ · Kg ⁻¹	Na ⁺	4.28 ± 0.33
P total (g/kg)	37.6		K ⁺	19.39 ± 5.32
P asimilable (g/kg)	3.07±0.61		Ca ²⁺	21.15 ± 2.52
Ácidos húmicos	17.0±0.2		Mg ²⁺	5.45 ± 0.69
Ácidos fúlvicos	28.4 ± 0.2		Suma bases (V)	50.27
CE (mS) (25 °C) (1:2)	9.0		CIC (T)	46.35
% CaCO ₃ equivalente	27.4 ± 0.4		% Saturación de bases	Sat

(1) Materia orgánica medida por digestión caliente, (2) Materia orgánica medida por combustión a 450°C

1.3. Condiciones de elaboración del té de compost

Experimento 1

Para la elaboración del té de compost en este experimento, se mezclaron 100 L de agua destilada con 1,5 Kg de compost de lodos de depuradora. La mezcla se sometió a aireación constante para mantener el sistema en condiciones aerobias durante 7 días. La temperatura se mantuvo igualmente constante a 23 °C durante los 7 días mediante la incorporación de un termostato. A lo largo de los 7 días que duró el proceso de maduración se cogieron muestras en intervalos de 12 horas para controlar ciertos parámetros y establecer así cual es el período adecuado de elaboración.

Experimento 2

Este proceso se repitió en dos ocasiones. En ambas ocasiones se midieron los mismos parámetros y se testaron las mismas condiciones de elaboración con la particularidad que esta vez se añadieron 100 mL de melaza al inicio del proceso para comprobar si esta fuente extra de carbono influía o no positivamente en el producto final.

1.4. Determinaciones analíticas

1.4.1. Parámetros físico-químicos

Determinación del pH

Por medición directa sobre alícuota de la muestra con un pHmetro Crison GPL 21.

Determinación de la Conductividad Eléctrica

Por medición directa sobre una alícuota de la muestra en conductímetro Crison 522.

Medida del residuo seco

Por gravimetría tras el secado de la muestra a 105°C durante 8 horas.

Cantidad de carbono orgánico

Por el método Tyurin, por oxidación total de la materia orgánica existente y posterior valoración por retroceso del exceso de oxidante.

Determinación de la cantidad de nitrógeno amoniacal

Mediante valoración directa a partir de una alícuota de la muestra por el método Kjeldahl.

Determinación de la cantidad de potasio

Por precipitación en medio ligeramente alcalino en forma de tetrafenilborato de potasio.

Determinación de la cantidad de fósforo

Por precipitación en medio ligeramente alcalino en forma de tetrafenilborato de potasio.

1.4.2. Parámetros biológicos

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos

Te de compost adicionado de melaza (Experimento 2)

El recuento de microorganismo mesófilos aerobios presentes en el té de compost adicionado de melaza se realizó a lo largo de los 7 días de la elaboración del mismo, para ello se tomaron muestras a

las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas de elaboración y se procedió a su recuento mediante la técnica de diluciones seriadas y su posterior recuento en placa en medio TSA tras su incubación a 28 °C durante 5 días en condiciones aeróbicas.

Todos los recuentos se realizaron por triplicado expresándose los resultados como unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

Te de compost sin la adición de melaza (Experimento 1)

El recuento de microorganismo mesófilos aerobios presentes en el té de compost se realizó a lo largo de los 7 días de elaboración del mismo, para ello se tomaron muestras de té de compost a las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 168 horas de elaboración y se procedió a su recuento mediante la técnica de diluciones seriadas y su posterior recuento en placa con medio TSA tras su incubación a 28 °C durante 5 días en condiciones aeróbicas.

Todos los recuentos se realizaron por triplicado expresándose los resultados como unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

Medio de cultivo utilizado

Medio TSA

El medio Triptona Soja Agar (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) (Avidano et al., 2005) es un medio general, rico en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales vitaminas y también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos por lo que va a permitir el crecimiento de una gran mayoría de bacterias. Su composición se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8.- Composición del medio Triptona Soja Agar (TSA) (g/L)

Peptona de Caseína	15
Peptona de Soja	5
Cloruro Sódico	5
Agar	16
Agua destilada 1000 mL	

pH final = 7,2 \pm 0.2

1.4.2. Concentración de metales pesados asimilables

Por digestión y posterior determinación de la concentración de cada elemento por ICP-masas en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

2. ENSAYOS DE BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS

2.1. Selección y aislamiento de microorganismos cultivables presentes en el té de compost

A partir de las placas de TSA sembradas con alícuotas de 100 mL de diferentes diluciones y tras 5 días de incubación a 28 °C en condiciones aeróbicas, se estableció el criterio morfológico para la discriminación de colonias. Así, se aislaron y obtuvieron cultivos puros en medio TSA de todas las colonias que presentaban diferente morfología según: forma, elevación, borde, tamaño y coloración.

2.2. Preparación de inóculos.

Una vez realizados los aislamientos, cada una de las cepas aisladas se resembró sucesivamente para asegurar que se trataba de un cultivo puro. A continuación y a partir de colonias aisladas se prepararon los inóculos. Dichos inóculos se prepararon sembrando en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio TSB una pequeña porción de cada uno de

los aislamientos y dejándolo incubar durante 24h, en agitación constante de 100 rpm y a 28 °C de temperatura.

2.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación, en nuestro caso, haciendo referencia a la presencia de metales pesados se podría definir como concentración más baja de cada uno de los metales ensayados que inhibían el crecimiento de las cepas objeto de estudio.

Para comprobar la tolerancia de los microorganismos al Pb, Cd, Cu y Zn y determinar su CMI, se utilizó el medio LPM sólido modificado con la adición de soluciones de metales pesados en las formas siguientes: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{N}_2\text{O}_6\text{Zn} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Según la toxicidad de cada uno de ellos, se partió de diferentes concentraciones iniciales las cuáles fuimos aumentando en un valor doble respecto a la anterior, los valores utilizados se muestran en la Tabla 9. Así, el Cu, Zn y Pb se ensayó desde 0,25 hasta 16 mM y el Cd desde 0,015 hasta 4mM.

Tabla 9.- Concentraciones estudiadas para cada metal pesado

Metal	Concentraciones ensayadas (mM)	Metal	Concentraciones ensayadas (mM)
Cobre	0,25 – 16	Plomo	0,125 - 16
Zinc	0,25 – 16	Cadmio	0.015 – 4

Para llevar a cabo esta experiencia, se utilizaron placas con medio LPM y LPM modificado, cuya preparación se detalla a continuación.

Medio LPM

Se trata de un medio oligotrófico, con una baja concentración de fosfatos. Debido a ello, está indicado para realizar ensayos con metales pesados, ya que los fosfatos provocan la precipitación de los metales, convirtiéndolos en no biodisponibles. Al disminuir la concentración biodisponible de los metales pesados, los resultados de tolerancia no serían reales, ya que la concentración a la que se encontrarían sometidos los microorganismos sería menor a la ensayada.

Composición

- * 100 mL de la solución madre de sales (Tabla 10),
- * 100 mL de solución de peptona
- * 100 mL de CaCl₂ (10 mM)
- * 0,4 mL de solución de tiamina
- * 5 mL de glicerol
- * Agua destilada 700 mL

La preparación de medio LPM sólido incluye la adición de Agar (16 g/L).

Preparación

En un matraz erlenmeyer de 1 L de capacidad se adicionan todos los ingredientes excepto la solución de tiamina y se procede a su esterilización en autoclave a 121 °C durante 20 min. Tras la esterilización, y una vez enfriado el medio a 40 °C, se añade la solución de tiamina previamente esterilizada por filtración y una cantidad apropiada de solución de metal.

Preparación de soluciones:

Solución madre de sales.

En un matraz aforado se mezclan las sales que se detallan en la Tabla 10 y se rellena con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 1 L. El pH de la solución madre de sales tiene que ajustarse al rango 7,0-7,4, mediante el uso de HCl (1M).

Tabla 10.- Composición química de la solución madre de sales utilizada para preparar el medio LPM (g/L)

NaCl	4,5
KCl	1,5
NH ₄ Cl	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
MgCl ₂ solution (1 M)	1
ZnSO ₄	0,5
Tris base	14,5
Agua destilada	1000 mL

pH final 7,0 usando HCl 0,1 M.

Solución de peptona (10%)

Se introducen en un matraz 10 g de peptona y se enrasa hasta 100 mL con agua destilada. Posteriormente, esta solución se agitó con un agitador magnético hasta su completa disolución.

Solución de CaCl₂ (10 mM)

Se introducen en un matraz 11,1g de CaCl₂ y se enrasa con agua destilada hasta 1 L. Posteriormente, se agita con un agitador magnético hasta su completa disolución.

Solución de tiamina (50 mg/mL)

En un eppendorf se introducen 50 mg de tiamina y se añade 1 mL de agua destilada agitándose manualmente hasta su completa disolución. Debido a que se trata de un compuesto sensible al calor, su esterilización se realizó a través de filtro Millipore de 0.20 μm de diámetro de poro.

Solución madre de metales

Para preparar la solución madre de metal, se pesa la cantidad adecuada del metal a ensayar (Tabla 11) y se resuspende en 10 mL de una solución de perclorato sódico al 0,1 M con un pH de 4 (para evitar la precipitación del metal). De este modo se obtiene una solución de cada metal con una concentración final 1 M a partir de las cuales, se modificó el medio LMP.

Tabla 11.- Cantidad de metal (g) necesaria para la solución madre 1 M

METAL	CANTIDAD (g)	METAL	CANTIDAD (g)
Cobre	2,41	Plomo	3,85
Zinc	2,97	Cadmio	3,08

Una vez obtenida las 4 soluciones se añadirán, esterilizadas previamente por filtración a través de un filtro de 0.45 mm, tal y como se ha explicado anteriormente al medio LPM templado.

Procedimiento

Las placas preparadas con las distintas soluciones de los diferentes metales pesados se subdividieron en ocho sectores iguales sobre los que se sembraron alícuotas de 5 μL de un inóculo de 24 horas de cada una de las cepas seleccionadas. El mismo método se

llevó a cabo con placas de control (placas sin metal). Finalmente, las placas se incubaron a 28 °C durante 14 días para observar el crecimiento de bacterias.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se realizaron controles, al final del proceso, del pH en las placas con tiras de papel indicador de pH, para descartar un nivel inadecuado de este factor como causa del no crecimiento.

2.4. Análisis filogenético de microorganismos resistentes a metales pesados

2.4.1. Extracción de ADN

De cada uno de los aislados se obtuvieron colonias de 24 h y con un palillo de madera estéril se introdujeron en las columnas suministradas por el QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Hilden, Alemania, de Qiagen para continuar la extracción de acuerdo con el protocolo del fabricante.

1. Poner una pequeña cantidad en un tubo de microcentrífuga de 2 mL (no incluido) y colocar en frío.
2. Añadir 1,4 mL Buffer ASL a cada muestra. Vortear durante 1 minuto o hasta homogeneización.
3. Calentar la suspensión 5 minutos (70 °C G-, 95 °C G+).
4. Vortear 15 segundos y centrifugar 1 minuto.
5. Pipetear 1.2 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 5. mL.
6. Adicionar una tableta de Inhibitex y voltear enseguida un minuto para suspender la tableta. Incubar un minuto a temperatura ambiente para que los inhibidores se adsorban en la matriz Inhibitex.

7. Centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.
8. Pipetear el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Desechar el pellet. Volver a centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.
9. Pipetear 15 μ L de proteinasa K en un nuevo tubo de microcentrífuga.
10. Pipetear 200 μ L del sobrenadante del paso 8 en el tubo de microcentrífuga que contiene la proteinasa K.
11. Añadir 200 μ L de Buffer AL y vortear 15 segundos.
12. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
13. Añadir 200 μ L de etanol (96 – 100%) al lisado y vortear.
14. Etiquetar la columna de centrifugación y colocarla en un tubo de microcentrífuga. Añadir el lisado completo del paso 13 en la columna de centrifugación. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Repetir el proceso colocando la columna en un nuevo tubo, y descartar los tubos con el filtrado.
15. Adicionar 500 μ L de Buffer AW1 sobre la columna colocada en un nuevo tubo de microcentrífuga. Centrifugar 3 minutos y desechar el tubo con el filtrado.
16. Adicionar 500 μ L de Buffer AW2 sobre la columna colocada en un nuevo tubo de microcentrífuga. Centrifugar 3 minutos y desechar el tubo con el filtrado.
17. Pipetear 200 μ L de Buffer AE sobre la membrana de la columna de filtración colocada en un nuevo tubo de microcentrífuga. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad para eluir el ADN.

2.4.2. Amplificación por PCR del gen codificante del ARNr 16S

Para la amplificación parcial del gen codificante del ARNr 16S, se utilizaron los cebadores universales para el Dominio Bacteria fD1 y rD1, descritos por Weisburg et al., 1991, y cuya secuencia se indica en la Tabla 12.

Tabla 12.-Cebadores universales descritos por Weisburg et al., 1991.

Cebador	Secuencia* (5' 3')
fD1	*ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	ccggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC

*La secuencia escrita en minúscula corresponde a colas artificiales agregadas para facilitar la clonación del fragmento amplificado.

Los cebadores amplifican casi la práctica totalidad del gen del ARNr 16S. Dichos cebadores fueron sintetizados por Sigma-Genosis (Reino Unido). La amplificación se realizó empleando como molde 4 μ l de sobrenadante de los lisados, al que se añadieron 46 μ l de una mezcla de reacción para PCR, consistente en: AmpliTaq-Gold Buffer de reacción 10X (Applied Biosystems, Alemania), 5 μ l; MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems, Alemania), 3 μ l, (concentración final 1,5 μ M); mezcla de dNTPs (Mbl, España), 1 μ l (concentración final 200 μ M de cada nucleótido); seroalbúmina bobina (10 mg/mL, New England Biolabs, Reino Unido), 1 μ l (concentración final, 0,2 μ g/ μ l); Dimetil sulfóxido (Sigma), 2,5 μ l (5%); 20 pmol de cada cebador, y 1 U de AmpliTaq-Gold hot-start polimerasa (Applied Biosystems, Alemania). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer PCR 2400 (Perkin Elmer, USA). El perfil de temperaturas fue el descrito previamente por Vinuesa et al., 1998, a excepción del paso de desnaturalización inicial, que se aumentó hasta una duración de 7 minutos por requerimiento de la polimerasa empleada.

Los productos de PCR obtenidos fueron comprobados en un gel de agarosa al 1% (P/V) y las bandas del tamaño esperado (aproximadamente 1,5 Kb) fueron purificadas utilizando el kit Qiaquick II (Quiagen, Germany).

2.4.3. Secuenciación

La secuenciación de ADN de doble cadena fue efectuada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada) mediante el método de los terminadores marcados con fluorocromos, usando el kit ABI-PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Alemania) y un secuenciador automático Applied Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Alemania).

2.4.4. Análisis informático de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados mediante el programa informático de libre distribución Chromas v. 1.51. Mediante herramientas de computación disponibles en el servidor web de libre acceso del European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>), las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas archivadas en las base de datos EMBL y GeneBank. Para llevar a cabo los alineamientos de las secuencias, se empleó el programa Clustal X2 (Jeanmougin et al., 1998) empleando los parámetros por defecto.

El cálculo de las matrices de distancia entre las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos mediante el método Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987), se realizó con el software de libre distribución MEGA4 (Kumar et al., 2001). En el árbol filogenético se tomó como criterio la no inclusión de los huecos (gaps) del alineamiento. Los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo con reemplazamiento (método Bootstrap) (Felsenstein, 1985), y los porcentajes superiores al 50% aparecen reflejados en los árboles correspondientes.

2.5. Experimentos de eliminación

2.5.1. Cultivos en Batch

Para comprobar la capacidad de las cepas para retirar metales del medio, se llevaron a cabo estudios con cultivos en batch. Para ello se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad que contenían 50 mL de medio LPM adicionado con distintas cantidades de solución madre de los diferentes metales pesados para conseguir una concentración final de 4 mM en el caso del Cd y 8 mM para el Zn, Cu y Pb. Todos los matraces fueron inoculados con 1 mL de una suspensión bacteriana previamente crecida durante 24 h en LPM líquido (sin metal) en condiciones aeróbicas. Los cultivos se incubaron durante 3 días manteniéndose las condiciones de temperatura y agitación constantes, 28 °C y 100 rpm en un agitador orbital (HWY-211) a lo largo dicho período. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas para elaborar una curva de crecimiento, siguiendo la técnica de recuento en placa anteriormente descrita, y poder relacionar el número de microorganismos presentes con la cantidad de metal retirado en el momento de crecimiento máximo.

Una vez establecido dicho valor se repitió el proceso para tomar muestras y analizarlas mediante ICP-masas y Microscopía Electrónica de Transmisión.

2.5.2. Estudio por ICP-masas

Una vez determinado el tiempo de incubación en 24 h, mediante el seguimiento del crecimiento microbiano hasta las 72 horas, se tomaron 2 mL de muestra de cada uno de los matraces a las 24 h y se llevaron a analizar mediante Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo.

La técnica de ICP-masas, es una técnica de análisis inorgánico que es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la

tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud (ng/L – mg/L). Consiste en un equipo dotado de un monocromador posterior a la muestra y una serie de detectores dedicados a cada elemento en diferentes posiciones del plano focal. Su principal característica es que posee unos límites de detección para la mayoría de los elementos de unas pocas ppb – ppt que la hace ideal para el análisis de elementos traza. La muestra líquida es vaporizada e ionizada. Los iones una vez formados pasan al espectrómetro de masas donde son separados y detectados mediante un analizador.

En este caso, el objetivo es cuantificar la cantidad de metal presente en la muestra de medio LPM transcurridas 24 horas desde la inoculación. Comparando esta cantidad, con la cantidad inicial de metal en el medio podremos fijar la cantidad de metal retirado por la bacteria.

2.5.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

El pretratamiento al que fueron sometidas las muestras para poder ser visualizadas en el equipo de microscopía electrónica de transmisión fue el siguiente:

- 1.- Prefijación de las muestras en glutaraldehído 2% + formaldehído 1,0%, en tampón cacodilato 0,05M, pH 7,4; 4h (0-4) °C.
- 2.- Lavado de las muestras en tampón cacodilato (0,1M, pH 7,4). Tres cambios de 10 minutos a 4 °C.
- 3.- Deshidratación en gradiente de concentraciones crecientes de etanol, comenzando con una disolución al 50%, a continuación con disoluciones al 75% y 9%. Por último se realizan tres cambios con etanol absoluto. El tiempo de inmersión en cada una de las disoluciones era de 10 minutos y, cada paso se llevó a cabo a 4 °C.
- 4.- Infiltración en una mezcla 1:2 de Etanol 100% y resina Epon durante 1 hora.

- 5.- Infiltración en una mezcla 1:1 de Etanol 100% y resina Epon durante 1 hora.
- 6.- Infiltración en una mezcla 2:1 de Etanol 100% y resina Epon durante 1 hora.
- 7.- Infiltración en resina Epon completa durante 24 horas.
- 8.- Polimerización durante 48 horas.
- 9.- Realización de cortes en secciones ultrafinas (500-700 micras), montaje en rejillas de níquel y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo todas las muestras excepto las que contienen plomo que se contrastan sólo con acetato de uranilo.

Una vez fijadas las muestras, se realizó el estudio de microscopía en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, en las unidades de preparación de muestras biológicas y transmisión electrónica de alta resolución.

3. EXPERIMENTOS CON MICROCOSMOS

3.1. Suelo empleado

El suelo utilizado en los ensayos de microcosmos es un suelo característico de olivar, obtenido en la Provincia de Jaén, en un terreno de secano. Se trata de un Calcisol Hipocálcico con una textura franco-arcillo-limosa en superficie, conteniendo un 44,1% de limos, 39,4% de arcillas, 16,4% de arenas y un 0,6% de gravas. La composición química de la muestra fue la siguiente: 0,946% de materia orgánica; pH (agua) de 7,9; nitrógeno total, 0,09%; Fósforo total, 8,5 mg Kg⁻¹.

3.2. Montaje de microcosmos y establecimiento de las condiciones de trabajo

Los microcosmos, tal y como se refleja en la Figura 18, consistían en recipientes troncocónicos de plástico inerte (PVC) y opaco (para evitar la entrada de luz). Los recipientes se lavaron con agua destilada y alcohol antes de su uso.

Sobre el fondo de los microcosmos se colocó un filtro de fibra de vidrio cubierto por una capa de 230 g de suelo de olivar, previamente tamizado y seleccionado de fracción inferior a 2 mm. Para impedir la excesiva evaporación de agua en el suelo, se colocó un plato invertido en la parte superior del microcosmos que limitara la evaporación superficial. Para evitar la pérdida de posibles lixiviados, en la parte inferior del microcosmos, se colocaron recipientes inertes.

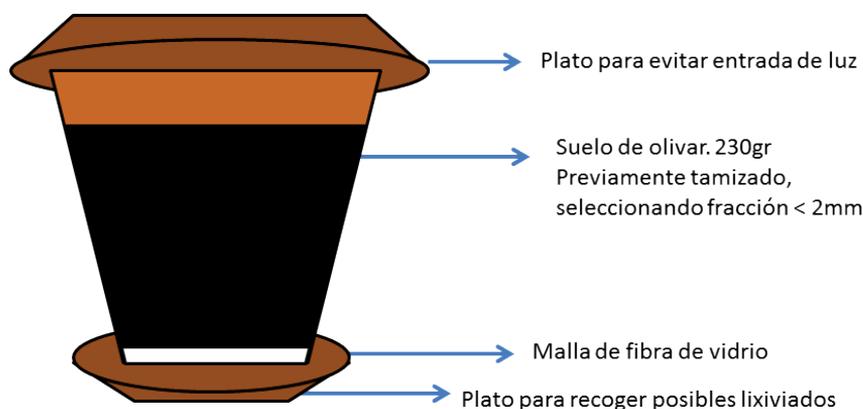


Figura 18.- Esquema de un microcosmo

Una vez elaborados los microcosmos edáficos, éstos se mantuvieron a distintas temperaturas: 20-21°C (temperatura ambiente) y 35°C.

Se diseñaron 4 series de tratamientos que utilizaban agua y/o té de compost en las irrigaciones:

- * **Tratamiento A (control):** irrigaciones únicamente con agua destilada.
- * **Tratamiento B:** primera irrigación con té de compost y el resto con agua destilada.
- * **Tratamiento C:** irrigaciones únicamente con té de compost.
- * **Tratamiento D:** primera irrigación con té de compost, posteriormente agua destilada, día 15 otra vez té de compost, a continuación agua, día 45 té de compost de nuevo y finalmente agua destilada.

La experimentación se extendió en un tiempo total de 90 días a lo largo de los cuales se hicieron 7 muestreos (4, 8, 15, 30, 45, 60 y 90 días) obteniéndose por lo tanto un total de 56 microcosmos (2 temperaturas x 4 tratamientos x 7 muestreos) (Figura 19).



Figura 19.-Microcosmos incubados a temperatura ambiente (izda) y en estufa a 35 °C (dcha)

3.3. Determinaciones analíticas

3.3.1. Parámetros físico-químicos

Medida de pH

Las medidas de pH de las muestras se efectuaron en agua destilada y en solución de ClK 0.1N. Las medidas en agua destilada se efectuaron en relación 1:1 (20 g de muestra en 20 mL de agua destilada). La medida en solución de ClK se efectuó manteniendo la misma proporción. Las medidas fueron efectuadas mediante un pHmetro modelo Crison micropH 2001.

Medida de la conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica fue medida a partir de la pasta saturada, que se preparó añadiendo a la muestra, agua destilada hasta la completa saturación de los poros. Esto se consigue una vez la superficie esté brillante, no se aprecien dos fases, al realizar un corte en la pasta con la espátula éste debe cerrarse al golpear la pasta originando una simple línea, y por último, al tomar la pasta con la espátula, la pasta debe deslizarse por ella sin dejar rastros. El extracto de la pasta se obtiene por filtración de la misma a través de papel de filtro *Whatman*, empleando un kitasato y una bomba de vacío. Las medidas fueron tomadas con un conductímetro marca Crison modelo 522.

% de CaCO_3

La cantidad de CaCO_3 de un suelo se mide a partir del CO_2 desprendido en la reacción de los carbonatos con HCl. Para ello, en un matraz Erlenmeyer se introduce 1 g de muestra tamizada junto a un tubo que contiene HCl 1:1. A continuación el matraz se conecta al calcímetro de Bernard y se vierte el HCl contenido

en el tubo. Al reaccionar la muestra con el ácido se desprende CO₂ procedente de los carbonatos presentes en la muestra. El gas se cuantifica observando el volumen de agua carbonatada desplazada por el anhídrido carbónico generado.

Carbono orgánico (C.O.)

Se basa en la valoración del dicromato potásico sobrante tras la oxidación de la materia orgánica. Se pesa entre 0,1 y 0,5 g de muestra, según el carácter orgánico de la muestra, y se introduce en un matraz erlenmeyer que se mezcla con 10 mL de disolución de dicromato potásico 0,4N al 50% de H₂SO₄ concentrado, unas bolas de vidrio y una pizca de sulfato de plata como catalizador. Los matraces se llevan a ebullición durante 5 minutos, una vez fríos se valora el exceso de dicromato potásico frente a sal de mohr 0.1N usando como indicador el ácido fenil antranílico.

Determinación del nitrógeno total (Kjeldahl)

Se empleó el método descrito por Bouat y Crouzet (1965) y por el Soil Conservation Service (1972). Se toman 2 g de suelo tamizado y se colocan en un tubo digestor al que se añade 1 g de K₂SO₄, 10 mL de H₂SO₄ concentrado, 1 mL de solución sulfúrica de selenio y bolas de vidrio. Tras una digestión de 1h a 100 °C y 1,5h a 350 °C en un bloque digestor P-Selecta modelo RAT (508) todas las formas de nitrógeno pasaron a sales amónicas. Tras enfriar, la muestra se diluye en un matraz aforado de 100 mL. Mediante un destilador manual, se procede a la digestión de 25 mL de la muestra con NaOH al 30%, lo que origina la transformación de las sales amónicas a nitrógeno gaseoso, el cual es determinado mediante valoración frente a ácido sulfúrico 0.005N, empleando como indicador Mixto Buchi.

Determinación del fósforo asimilable

Se usó el método basado en Olsen-Watanable. Se pesa 5 g de suelo tamizado y se deja en agitación con 100 mL de solución extractora (NaHCO₃ 0,5M a pH 8,5) durante 30 minutos. Posteriormente se filtra a través de papel Whatman n° 40. Finalmente se mezcla 0,1 mL del extracto con 1,6 mL de solución de ácido ascórbico, 2 mL de solución extractora y 6,2 mL de agua destilada. La lectura se realiza en un espectrofotómetro marca SPECTRONIC 20D Milton Roy Company.

Determinación del potasio asimilable

Para la determinación de la cantidad de potasio asimilable se pesan 5 g que se mezclan con 40 mL de acetato amónico 1N y se deja macerar toda la noche. Pasado este tiempo se centrifuga a 1600 rpm durante 15 minutos (HERMLE ZK 510 BGH) y se decanta el sobrenadante sobre un matraz aforado de 100 mL. A continuación se deja macerar de nuevo el suelo con 30 mL de acetato amónico 1N durante 10 minutos centrifugando posteriormente con las mismas condiciones que se usaron anteriormente para volver a decantar el sobrenadante en el mismo matraz aforado. Esta operación se repite una vez más. Finalmente se enrasa el matraz con acetato amónico y se procede a medir el potasio mediante fotómetro de llama EPPENDORF GERÄTEBAU Netheler + Ninz GMBH Hamburg.

3.3.2. Parámetros biológicos

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos

Misma metodología que la descrita anteriormente.

Actividades enzimáticas

Actividad enzimática fosfatasa

La determinación de la actividad fosfatasa en las muestras homogenizadas de suelo se realizaron en todos los casos acorde al método descrito por Tabatabai (1982). Las fosfatasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres y los anhídridos del ácido fosfórico. La fosfatasas medidas en el suelo reflejan la actividad de enzimas unidas a los coloides del suelo y a las sustancias húmicas, fosfatasas libres en la solución del suelo, y fosfatasas asociadas con plantas vivas o muertas o con células microbianas (Skujins, 1976; Nannipieri et al., 1990). Las enzimas fosfatasas pueden ser un buen indicador de la mineralización del fósforo orgánico y de la actividad biológica de los suelos (Speir and Ross, 1978; Dick and Tabatabai, 1993). Estas enzimas se clasifican como ácidas o básicas según muestren su actividad óptima en rango ácido o alcalino respectivamente.

Reactivos

- * *p*-nitrofenil fosfato tetrahidrato (sustrato)
- * *p*-nitrofenol (indicador)
- * Tolueno
- * CaCl_2
- * Tampón universal modificado (MUB): 12.1g/l de Trihidroximetil Aminometano (THAM), 11.6 g/l de de ácido maleico, 14 g/l de ácido cítrico, 6.3g/l de H_2BO_4 y 488mL de NaOH 1N.

Para la determinación de la fosfatasa ácida se utiliza MUB modificado a pH 6.5 y para la fosfatasa básica MUB modificado a pH 11. Para ello, se toman 200 mL de MUB y se ajusta el pH añadiendo HCl 0.1N o NaOH 0.1N y se completa el volumen hasta 1 litro con agua destilada.

El *p*-nitrofenil fosfato se prepara disolviendo 0.42g de *p*-nitrofenil fosfato tetrahidrato en 40mL de MUB a pH 6.5 (F. ácida) o pH 11 (F. básica). Una vez disuelto se completa el volumen hasta 50mL con el mismo MUB.

La solución de *p*-nitrofenil fosfato se prepara disolviendo 1g de *p*-nitrofenol en 70mL de agua y una vez disuelto se completa hasta 1 L.

Procedimiento

Se toma 1 g de suelo (peso seco) y se mezcla con 0,2mL de tolueno, 1mL de solución *p*-nitrofenol fosfato y 4mL de MUB (pH 6,6 o pH 11). Una vez mezclado se incuba 1 hora a 37 °C. La incubación se detiene por la adición de 1mL de CaCl₂ 0,5M y 4mL de NaOH 0,5N. A continuación la mezcla se centrifuga 10 minutos a 1300 rpm. Se mide la absorbancia del sobrenadante a 410 nm.

Curva patrón

Para la construcción de la recta patrón se prepara una solución madre de *p*-nitrofenol, diluyendo 1mL de solución de *p*-nitrofenol en 10mL de agua destilada. A continuación se toman alícuotas de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l de *p*-nitrofenol. Seguidamente los tubos se incuban 1 hora a 37 °C y después se añade 1 mL de CaCl₂ 0,5M y 4 mL de NaOH 0,5N. Centrifugar y medir la absorbancia a 410nm.

Actividad enzimática arisulfatasa

La determinación de la actividad arisulfatasa en las muestras homogenizadas de suelo se realizó en todos los casos acorde al método descrito por Tabatabai (1982). Las arisulfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del anión arilsulfato por rotura del enlace O – S, son capaces de acompañar la génesis del anión SO_4^{2-} al ritmo que exige la demanda nutricional de plantas y microorganismos, pues los procesos de desorción química no son capaces de liberar dicho anión al ritmo que precisa la planta. Esta capacidad corresponde a la arisulfatasa (arisulfato sulfohidrolasa) y en el suelo es un conjunto enzimático de baja especificidad que cataliza la hidrólisis de ésteres de aromáticos y no aromáticos de sulfato (R-O-SO_3), liberando fenoles (R-OH) y al anión (SO_4^{2-}). (García et al., 2003).

Reactivos

- * p-nitrofenil sulfato tetrahidrato 0,025M (sustrato)
- * p-nitrofenol (indicador)
- * Tolueno
- * CaCl_2 0,5M
- * Tampón acetato 0.5M, pH 5.8
- * NaOH
- * HCl

El p-nitrofenil sulfato tetrahidrato (sustrato) se prepara disolviendo 0.312g de p-nitrofenil sulfato de potasio en 50 mL tampón acetato.

El tampón acetato 0,5M se prepara disolviendo 68 g de acetato sódico trihidrato en 700 mL de agua añadiendo posteriormente 1,7 mL de ácido acético glacial (99%). Finalmente, el volumen se ajustó hasta un litro con agua destilada.

Procedimiento

Se toma 1gr de suelo (peso seco) y se mezcla con 0.25mL de tolueno, 1mL de solución p-nitrofenil sulfato y 4mL de tampón acetato 0.5M a pH 5.8. Una vez mezclado se incuba 1 hora a 37°C. La incubación se detiene por la adición de 1mL de CaCl₂ 0.5M y 4mL de NaOH 0.5N. A continuación la mezcla se centrifuga 10 minutos a 1300rpm. Se mide la absorbancia del sobrenadante a 410nm.

Curva patrón

El procedimiento para la obtención de la curva patrón de la actividad enzimática arisulfatasa es el mismo que el descrito anteriormente para la obtención de la curva patrón de la actividad enzimática fosfatasa.

3.3.3. Análisis de biodiversidad

Extracción del ADN bacteriano de las muestras de suelo

El ADN total se extrajo por triplicado a partir de 0,5 g del suelo correspondiente a los microcosmos que se muestrearon a los tiempos de 4, 8, 30 y 90 días, usando el kit FastDNA para suelo (PM Bio Laboratories Inc, EE.UU.) siguiendo los pasos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Tras el último paso se comprobó el ADN extraído mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se conservó a -20°C.

Amplificación

El paso siguiente a la extracción de ADN fue la amplificación de los genes correspondientes a los grupos de interés. Para ello se elaboró una mezcla compuesta mezclando 20 ml de cada una de las repeticiones.

A continuación se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes de las bacterias totales, bacterias ALP-harboring, bacterias aerobias oxidadoras de amonio (AOB) y arqueas de oxidadoras de amonio (AOA).

La PCR se realizó con 1 ml de ADN en un volumen total de 25 ml que contenía 200 nM de cada cebador (Tabla 13), tampón de reacción 1X [16 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mM de Tris-HCl 67 {pH 8,8}, MgCl_2 1,5 mM, 0,01% de Tween 20] (Biotherm™, GeneCraft, Alemania), MgCl_2 0,5 mM (Biotools, España), desoxirribonucleótido trifosfato 0,2 mM (dNTPs; Biotherm™, GeneCraft, Alemania), 0,4 mg·mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, Austria), 0,025 U de ADN polimerasa Bio-Therm™ (Biotherm™, GeneCraft, Alemania) y agua estéril. También se incluyeron controles que contenían todos los componentes excepto la muestra de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Flex (Analytik Jena, Alemania) siguiendo las condiciones descritas por Muyzer et al. (1993), Sakuray et al. (2008), Kowalchuk et al. (1997) y Francis et al. (2005) para bacterias totales, ALP-bacterias, AOB y AOA. Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, y la concentración de producto de PCR se determinó con el reactivo de cuantificación PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). La fluorescencia se midió utilizando un lector multimodo Anthos Zenyth 3100 (Anthos Labtec, Austria) y el software para detectores Anthos multimodo (versión 2.0.0.13).

Tabla 13.-Secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados en la reacción de PCR

Cebadores	Secuencia (5´-3´)	Grupo Bacteriano	Referencias
CG-P ₁	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGGCAC GGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	Bacterias Totales	Muyzer et al. (1993)
P ₂	ATTACCGCGGCTGCTGG		
ALPS-F730	CAG TGG GAC GAC CAC GAG GT	ALP-harboring	Sakurai et al. (2008)
ALPS-R1101	GAG GCC GAT CGG CAT GTCG		
CTO189F A+B	CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GGA G ^{RA} AAG CAG GGG ATC G	AOB	Kowalchuk et al. (1997)
CTO189C*	CGC CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GGA GGA AAG TAG GGG ATC G		
CTO654r	CTAG ^Y TTGTAGTTTCAAACGC		
Arch-amoAF	STAATGGTCTGGCTTAGACG	AOA	Francis et al (2005)
Arch-amoAR	GCGGCCATCCATCTGTATGT		

Separación de los fragmentos de ADN mediante DGGE

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización se llevó a cabo mediante la carga de 60 ng de producto de PCR en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturalización específica para cada grupo microbiano (Tabla 14). Un fragmento de ADN de 100 pb (Genecraft®, Alemania) actuó como marcador. Los geles se procesaron en TAE 1X (Tris-HCl 20mM, acetato 10 mM, Na₂EDTA 0,5) a 60 °C durante 16 h a 100 V mediante el uso de un Sistema de INGENYphorU (Ingeny International BV, Países Bajos). Los geles se tiñeron con nitrato de plata usando el Hoefer Automatizado Gel Stainer (Amersham Pharmacia Biotech, Alemania), se secó al aire y se escaneó para su posterior análisis de imagen.

Tabla 14.-Gradiente de desnaturalización usado en el DGGE

Grupo Bacteriano	% Acrilamida	Gradiente de Desnaturalización	Referencias
Bacterias Totales	7	50 - 70	Muyzer et al. (1993)
ALP-harboring	8.5	50 - 70	Sakurai et al. (2008)
AOB	8.5	40 - 65	Kowalchuk et al. (1997)
AOA	7	25 - 50	Francis et al (2005)

Análisis qPCR

La PCR cuantitativa (quantitative PCR, qPCR) o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, y una ADN polimerasa termoestable. A dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real.

Preparación de los estándares.

El primer paso es la elaboración de los estándares de ADN. Para ello, se realiza una amplificación por PCR convencional, aunque variando ciertos reactivos (Tabla 15) de al menos 5 repeticiones del fragmento de ADN que se quiere estudiar. Las copias de genes

obtenidas se agrupan en un nuevo eppendorf para seguidamente cuantificar la cantidad de ADN mediante la página web <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

Tabla 15.-Reactivos utilizados en la reacción de PCR (μL)

Agua destilada (RNase/DNase free)	14,075
Enhancer (5X)	5
10X Buffer para MyTaq	2,5
Primer forward (10 mM)	0,5
Primer reverse (10 mM)	0,5
dNTP (10 mM)	0,5
BSA (2%)	0,5
TMAC 1M	0,3
Taq polimerasa (5 U/ μL)	0,125
ADN	1

A partir de la muestra de ADN amplificada realizar diluciones seriadas para conseguir tubos con más o menos concentración de ADN, para posteriormente utilizarlos como estándares.

Reacción de qpcr

La reacción de PCR en tiempo real se realizó para bacterias totales, bacterias oxidadoras de amonio y arqueas oxidadoras de amonio usando un termociclador RotorGen 6200 (Corbett research - now Qiagen, Alemania) y el software serie 6000 del RotorGen (versión de software 1.7). Las condiciones de reacción, perfil de temperaturas y ciclos seguidos para cada grupo se detallan a continuación (Tabla 16):

Tabla 16.- Condiciones de reacción y temperaturas para los grupos de bacterias estudiados mediante qPCR

BACTERIAS TOTALES	
Mezcla	Perfil de temperaturas
Agua destilada → 5.6 µL	94 °C → 10 minutos
SYBR Green → 10 µL	95 °C → 20 segundos
Primer Forward → 0.8 µL	58 °C → 15 segundos
Primer Reward → 0.8 µL	72 °C → 30 segundos
BSA → 0.8 µL	40 ciclos
ADN → 2 µL	
BACTERIAS OXIDADORAS DE AMONIO (AOB) y ARQUEAS OXIDADORAS DE AMONIO (AOA)	
Mezcla	Perfil de temperaturas
Agua destilada → 7.3 µL	95 °C → 10 minutos
SYBR Green → 10 µL	95 °C → 40 segundos
Primer Forward → 0.2 µL	55 °C → 30 segundos
Primer Reward → 0.2 µL	72 °C → 25 segundos
BSA → 0.5 µL	40 ciclos
ADN → 2 µL	

3.3.4. Concentración de metales pesados asimilables

Misma metodología que la descrita anteriormente.

3.4. *Análisis estadístico*

Los tratamientos estadísticos que se han aplicaron a los resultados obtenidos en los diferentes apartados del punto 3.3 fueron:

Análisis de la varianza: construye varios tests y gráficos para determinar los factores que tienen un efecto significativo sobre los valores de una variable agrupados en niveles y la interacción, si la hubiera, entre varios factores. Identifica fuentes o causas de variación en los datos de cada variable. Los valores del F-test en la tabla de ANOVA nos permiten identificar los factores o fuentes de variación significativos. Por cada factor, el test de rango múltiple refleja las medias de cada nivel o grupo que son significativamente diferentes. Los gráficos de medias e interacción nos permiten interpretar los efectos de cada factor. Los gráficos de residuos evalúan la homogeneidad de varianza entre grupos o niveles, lo que valida los resultados del análisis.

Análisis factorial: cuyo objetivo es obtener un número de factores menor que el de las variables utilizadas, pero que expliquen la mayor cantidad de variabilidad de los datos. Para la factorización se empleó el método de los componentes principales, asumiendo que toda la variabilidad en los datos se debe a factores comunes, y para la extracción de factores se consideró un mínimo eigenvalue de 1. Para simplificar la explicación de los factores se usó rotación varimax, con la que cada factor se explica por una ecuación múltiple en la que los coeficientes son la carga de los factores obtenidos. Los valores de las variables en cada ecuación están estandarizados sustrayendo sus medias y dividiendo por las desviaciones estándar. El análisis también estima las comunalidades o la proporción de variabilidad atribuible a cada factor extraído.

Análisis discriminante: busca las funciones que mejor discriminan las muestras en niveles de una variable dependiente, basándose

en variables cuantitativas (variables independientes). La discriminación de niveles se evalúa por funciones que son una combinación lineal de variables independientes, al objeto de maximizar la distancia entre las medias de los niveles. Para determinar las variables independientes con significación en el modelo, se empleó el método stepwise y el criterio de $F > 4$ para la entrada y $F < 4$ para la eliminación de variables, hasta conseguir el modelo más simplificado posible. Cada función discriminante, que es ortogonal a las otras, es un factor o dimensión que diferencia cada una de las muestras en niveles, basándose en su valor en las variables independientes. Gráficos de funciones discriminantes con marcadores y centroides, así como matrices de factores con cargas, clarifican las diferencias y el poder discriminante de factores y variables.

Correlaciones entre pares de variables: se analizaron mediante el coeficiente estadístico del momento producto de Pearson. Este coeficiente, entre -1 y +1, mide la fortaleza de la relación lineal entre las variables y su significación estadística (P-value), considerando también el número de muestras incluidas en el análisis.

Análisis de regresión: muestra los resultados de ajustar un modelo o ecuación de regresión lineal múltiple para describir la relación entre una variable dependiente y varias variables independientes. El coeficiente R^2 indica el porcentaje de variabilidad en la variable dependiente explicado por el modelo. Este mismo estadístico ajustado al número de grados de libertad es más apropiado para comparar modelos con diferente número de variables independientes. El error estándar de la estimación corresponde a la desviación estándar de los residuos, que es útil para construir límites de predicción para nuevas observaciones. En otras palabras, es una indicación del error que se comete con el modelo al hacer estimaciones de la variable dependiente.

A top-down view of several petri dishes containing bacterial cultures on a yellow agar medium. The cultures exhibit various morphologies: some are large, dark, circular colonies; others are smaller, more irregular or star-shaped clusters; and some are very small, pinpoint-sized spots. The dishes are arranged in a grid-like pattern, with some partially visible at the edges. A semi-transparent horizontal bar is overlaid across the center of the image, containing the text 'Resultados y discusión'.

Resultados y discusión

1. ELABORACIÓN DEL TÉ DE COMPOST Y SUS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS.

1.1. Optimización del proceso de elaboración.

Dado que el objetivo de la primera fase de experimentación es el de conseguir un producto cuyo elemento activo sea la presencia de microorganismos viables, así como los productos derivados de su actividad metabólica y sus extractos celulares tras una posible lisis, se debe realizar un estudio de la evolución del producto durante el proceso de maceración, con el fin de determinar el tiempo óptimo del procesado para la elaboración y la recogida del té de compost. Para ello, ha sido necesario el establecimiento de las condiciones óptimas de trabajo para el correcto funcionamiento de la planta piloto.

En primer lugar, se elaboró un primer té de compost usando como materia prima compost de lodos de depuradora, durante el periodo de elaboración del té de compost, 7 días, se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 168 y 180 horas para hacer el seguimiento de varios parámetros (temperatura, pH y recuento en placas de bacterias mesófilas heterótrofas aerobias). Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 20, 21 y 22.

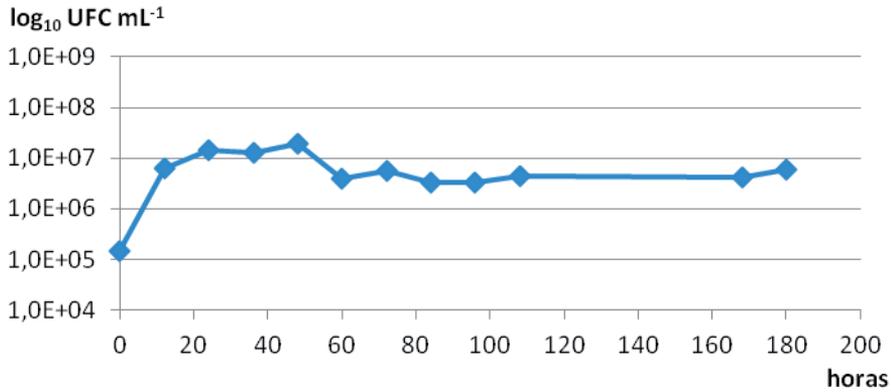


Figura 20.- Representación grafica de los valores obtenidos en los recuentos de bacterias mesófilas heterótrofas aerobias presentes en el té de compost fabricado sin la adición de melaza tras ser incubadas en medio TSA a 22 °C durante 4 días.

Los datos para la elaboración de dicha grafica se corresponden con la media aritmética de los datos de las tres repeticiones realizadas a los distintos tiempos.

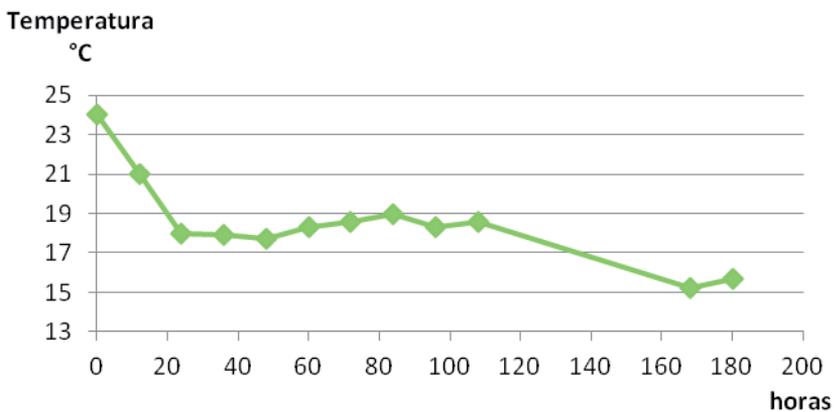


Figura 21.- Gráfico evolutivo de los valores de temperatura del té de compost en la planta piloto coincidiendo con los tiempos de las tomas de muestra para la realización del recuento de microorganismos viables

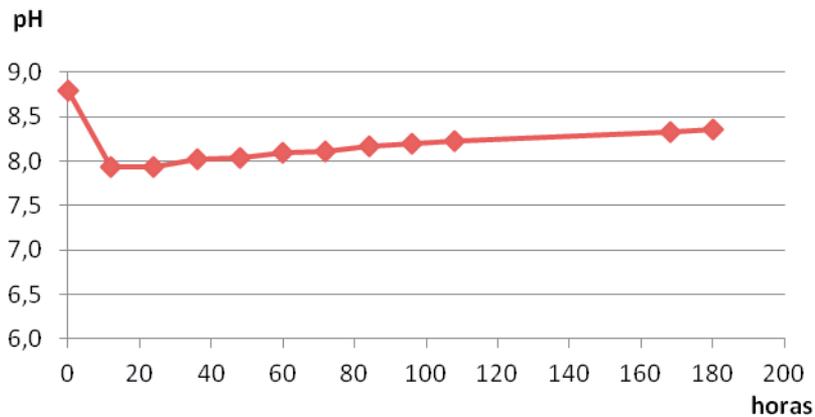


Figura 22.- Gráfico de la evolución de los valores de pH del té de compost en la planta piloto coincidiendo con los tiempos de las tomas de muestra para la realización del recuento de microorganismos viables

Posteriormente, se procedió a la elaboración de un nuevo té de compost, en cuya elaboración se adicionó la melaza con la finalidad de ver el efecto que este elemento podía ejercer sobre los parámetros estudiados con anterioridad. Los resultados de este segundo apartado se muestran en las figuras 23, 24 y 25.

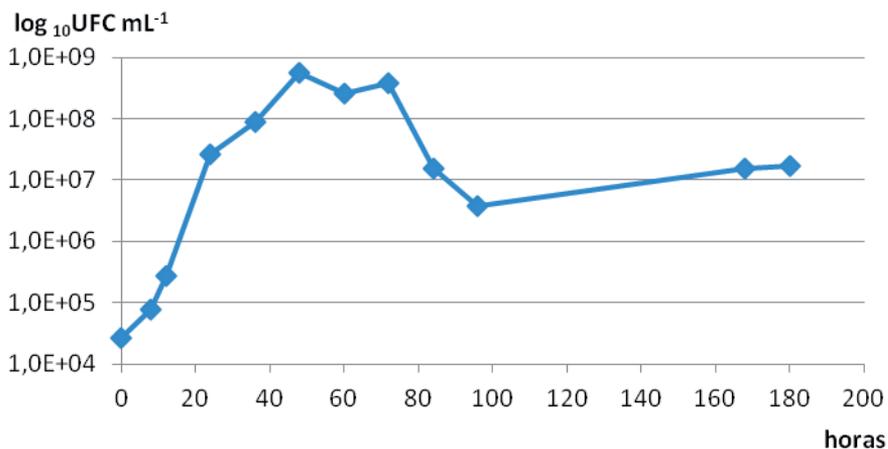


Figura 23.- Representación gráfica de los valores obtenidos en los recuentos de bacterias mesofilas heterótrofas aerobias presentes en el té de compost fabricado con la adición de melaza tras su incubación a 22°C en medio TSA durante 4 días.

Los datos para la elaboración de dicha grafica se corresponden con la media aritmética de los datos de las tres repeticiones realizadas a los distintos tiempos.

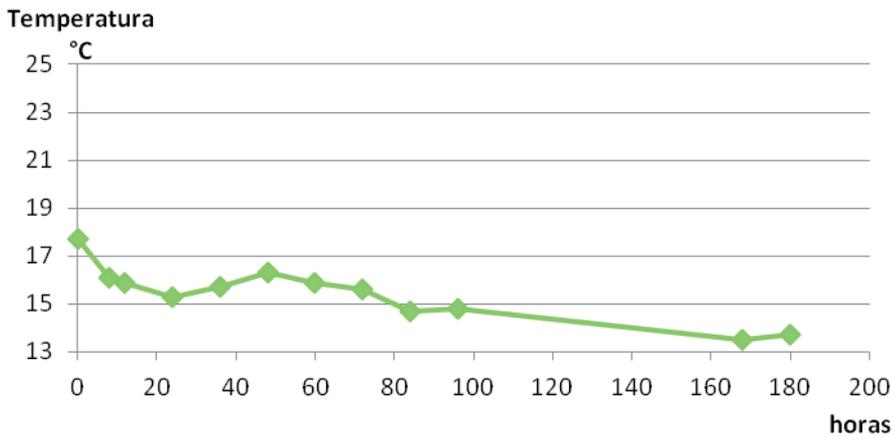


Figura 24.- Grafico de la evolución de la temperatura del té de compost en la planta piloto coincidiendo con los tiempos de las tomas de muestra para la realización del recuento de viables

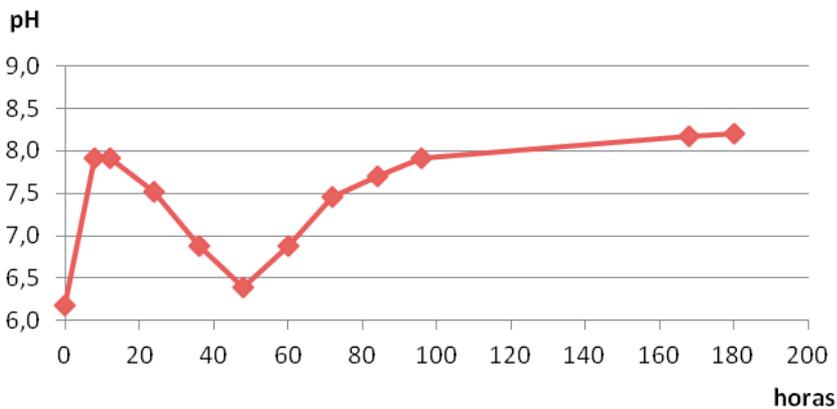


Figura 25.- Gráfico de la evolución de los valores de pH del té de compost en la planta piloto, coincidiendo con los tiempos de las tomas de muestra para la realización del recuento de viables

Tras analizar los datos obtenidos, se determinó que en el té de compost elaborado con melaza se producía un incremento mayor en el número de UFC mL⁻¹ a lo largo del proceso. No obstante, este efecto positivo se vio rápidamente paliado como consecuencia de algunos cambios significativos en el pH durante las primeras 48 horas del proceso de elaboración de té. Este hecho nos ha llevado a pensar que esa bajada en el pH puede ser debido a un aumento en la producción de ácidos como consecuencia de la actividad microbiana derivado de la presencia de melaza (compuesto muy rico en azúcares) en el sistema. El mismo comportamiento obtienen Shrestha et al. (2011) cuando utilizan melaza como suplemento en el té de compost partiendo de un compost hecho a partir del contenido del rumen. Sin embargo, este descenso en el pH no se ha observado cuando como suplemento en el té de compost utilizan melaza mezclada con extractos de algas marinas.

Así, teniendo en cuenta los datos anteriormente expuestos, se determinó que el té de compost elaborado sin melaza mantiene mucho más estable el sistema, situándolo en unos niveles de pH más próximos a la neutralidad y evitando posibles efectos indeseables difíciles de controlar.

En consecuencia, se decidió elaborar un té de compost sin la adición de melaza y se estableció que la duración del proceso de elaboración de té de compost debía ser de 5 días ya que a partir de ese tiempo se considera que el producto ha alcanzado un nivel de estabilidad óptimo para su posible aplicación.

1.2. Caracterización físico-química y microbiológica del té de compost.

Una vez determinado el método de elaboración del té, se procedió a la producción del mismo de acuerdo a las condiciones óptimas establecidas anteriormente para, a continuación, completar su caracterización con la búsqueda de microorganismos cultivables y el análisis de sus propiedades físicoquímicas.

Además de los parámetros microbiológicos, es interesante para poder tener una base de conocimientos completa, conocer otros parámetros físico-químicos del producto en referencia a su aplicación como biofertilizante. Por dicho motivo, además de todos los análisis anteriormente descritos se efectuaron cada 24 horas durante todo el proceso de elaboración del té, mediciones periódicas de varios parámetros físico-químicos cuyos resultados se muestran en las Tablas 17 y 18.

Tabla 17.- Valores de parámetros físico-químicos y microbiológicos del té de compost durante los días de elaboración del mismo

	pH	CE ₂₅ (µS/cm)	Residuo seco %(m/V)	% MO	% N _{amoniaca}	%K ₂ O	%P ₂ O ₅	UFC mL ⁻¹
0 días	7,1	137	0,0060	0,003	0,001	0,021	0,009	2,8E+04
1 días	7,3	500	0,0510	0,016	0,005	0,016	0,009	5,1E+07
2 días	7,4	527	0,0590	0,018	0,006	0,006	0,007	3,7E+06
3 días	7,5	582	0,1000	0,020	0,006	0,009	0,007	4,6E+06
4 días	8,4	638	0,0695	0,020	0,005	0,03	0,007	4,2E+06
5 días	8,4	649	0,0720	0,020	0,006	0,024	0,006	5,3E+06
Media	7,7	506	0,0596	0,016	0,005	0,018	0,008	1,1E+07

Tabla 18.- Valores de metales pesados asimilables del té de compost (ppb)

Muestra	Be	Sc	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Y	Mo
Té de compost	0	1,34	36,08	16,3	7,42	4,96	21,64	115,66	176,02	25,14	0,14	20,78
Muestra	Cd	In	Sn	Sb	Ba	Au	Tl	Pb	Bi	Th	U	
Té de compost	0,4	0,02	31,54	36,84	2,8	5,44	0,04	15,12	0,24	0,06	0,56	

En los estudios que llevaron a cabo Pant et al. (2012), se analiza la relación entre la calidad de 5 tipos de té de compost con respecto a los compost de los que procedían. Los compost estudiados fueron 1) compost de estiércol de pollo, 2) compost de residuos verdes, 3) vermicompost de restos de comida, 4) vermicompost maduro de estiércol de pollo (madurado durante 3 meses extra a partir del tiempo de maduración estándar) y 5) vermicompost fresco de estiércol de pollo (usado inmediatamente después del tiempo de maduración estándar).

Los datos de pH obtenidos en nuestro estudio, 7,4 de media, son muy similares a los obtenidos por Pant et al. (2012) ya que los valores de los cinco té de compost ensayados varían muy poco entre sí oscilando entre 7,3 y 7,9. Cabe también destacar que a excepción del té de compost obtenido a partir de compost de estiércol de pollo (6100 mS cm⁻¹) la C.E. se mueve dentro de unos márgenes de 700 y 1400 mS cm⁻¹, valores ligeramente superiores a los obtenidos en el té de compost de lodos de depuradora que se ha analizado en el presente trabajo. Es significativa también la proximidad de los resultados obtenidos por Pant et al. (2012) correspondientes a la cantidad de bacterias presentes en el té de compost ya que en ambos casos los datos se sitúan en 106 UFC mL⁻¹. Mientras que en el presente estudio, el número de bacterias por mL de té (en su punto óptimo de maduración) se encuentra en 5 106 UFC mL⁻¹, los té elaborados por Pant et al, (2012) oscilan entre 7 106 UFC mL⁻¹ y 9 106 UFC mL⁻¹.

Por otro lado es notable que la cantidad de nutrientes del presente té de compost de lodos no es demasiado alta, lo que contrasta con los resultados obtenidos por Naidu et al. (2013), que obtienen más de un 8% de N disuelto, un 4% de P y casi un 3% de K en un té de compost fabricado a partir de un compost obtenido de los racimos vacíos y los restos de molino del aceite de palma. No obstante, es importante tener en cuenta las importantes diferencias en el proceso de elaboración de cada uno de los té de compost. Mientras que Naidu et al. (2013) utilizan suplementos para aumentar la cantidad de microorganismos y siguen una proporción 1:5 (w/v), el té de compost de lodos de depuradora está mucho más diluido 1,5:100, además de no contar ningún tipo de suplemento.

2. RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL TÉ DE COMPOST A DISTINTOS METALES PESADOS

Como se ha descrito en material y métodos, el segundo bloque de experimentos, consistió en estudiar la tolerancia de parte de los microorganismos aislados originarios del té de compost a diferentes metales pesados.

2.1. Análisis y selección de microorganismos cultivables del té de compost

A partir de las placas donde se realizó el recuento de viables, se obtuvieron una amplia gama de colonias que se diferenciaban unas de otras tanto en forma, tamaño, coloración y nivel de mucosidad. Muchas de ellas presentaron un aspecto morfológico similar, por lo que tras realizar una selección, de acuerdo a dichas características morfológicas, se seleccionaron finalmente 30 colonias procedentes de los diferentes tiempos de muestreo.

A continuación se detallan las diferencias morfológicas de las colonias aisladas en medio de cultivo TSA:

Tabla 19.- Morfología de las colonias aisladas

Colonia	Forma	Borde	Elevación	Tamaño (mm)	Aspecto
1	Irregular	Ondulado	Plana	3	Crema
2	Circular	Entero	Convexa	4	Vainilla
3	Circular	Entero	Convexa	4	Salmón
4	Circular	Entero	Plana	3	Crema
5	Circular	Entero	Plana	2	Crema
6	Rizoide	Rizado	Pulvinada	3	Crema
7	Circular	Entero	Convexa	2	Crema
8	Rizoide	Serrado	Umbilicada	<1	Rosácea
9	Irregular	Entero	Plana	3	Crema
10	Circular	Entero	Convexa	4	Amarilla
11	Circular	Ondulado	Convexa	3	Crema
12	Circular	Entero	Plana	4	Anaranjado
13	Circular	Entero	Convexa	3	Anaranjado
14	Circular	Entero	Convexa	<1	Amarilla
15	Circular	Entero	Convexa	3	Amarillo
16	Circular	Serrado	Plana	2-3	Crema
17	Circular	Entero	Convexa	2	Crema
18	Circular	Entero	Convexa	2-3	Amarilla
19	Circular	Serrado	Plana	3-4	Crema
20	Circular	Entero	Elevada	2	Crema
21	Circular	Entero	Convexa	<1	Naranja
22	Circular	Entero	Convexa	2	Crema
23	Circular	Entero	Convexa	3	Crema
24	Circular	Ondulado	Convexa	<1	Amarilla
25	Circular	Entero	Convexa	2	Crema
26	Circular	Entero	Convexa	2-3	Marfil
27	Circular	Entero	Elevada	3	Salmón
28	Circular	Entero	Elevada	2-3	Crema
29	Puntiforme	Ondulado	Elevada	3-4	Crema
30	Irregular	Serrado	Elevada	3-4	Anaranjado

Según la Tabla 19, del total de las 30 colonias aisladas con diferentes morfologías sobre medio TSA, se observa que la gran mayoría de ellas presentaron forma circular, aunque en 6 de los casos la morfología era irregular, rizoide o puntiforme; 16 de ellas presentaban elevación convexa, 7 planas, solamente una pulvinada y una umbilicada y el resto elevadas. Presentaron diferentes coloraciones aunque predominaron las colonias de color crema. Respecto al tamaño, se observó que la mayoría de las colonias presentaban un tamaño entre 3 y 4 mm, no obstante, también se consideró un tamaño mínimo de 1 mm para las colonias más pequeñas, próximas a 1mm.

2.2. Determinación de los valores de Concentración Mínima Inhibitoria para cada una de las 30 cepas aisladas del té de compost

Con los experimentos que se llevaron a cabo, se pretendía determinar las concentraciones exactas de los metales pesados que inhiben el crecimiento visible de las cepas ensayadas.

Los valores de las CMI's medidos según la metodología seguida en material y métodos para los cuatro metales pesados ensayados con cada una de las 30 cepas de aisladas de té de compost se muestran en la Tabla 20.

Un valor inadecuado del pH del medio puede afectar a la disponibilidad del metal así como al crecimiento de las cepas. Para descartar que este parámetro fuera el responsable de la inhibición del crecimiento de las bacterias se midió con tiras de pH al final del proceso obteniéndose valores en todos los casos entre 5 y 7. Estos datos, sumados al hecho de que en las placas control los microorganismos se desarrollan normalmente, indica que los resultados inhibitorios obtenidos se deben únicamente a la presencia de los metales pesados en el medio.

Tabla 20.- Valores de CMI correspondientes a las 30 cepas en presencia de Cu, Zn, Pb y Cd

Cepa	CMI (mM)			
	Cu	Zn	Pb	Cd
1	2 < MIC < 4	0.25 < MIC < 0,5	0,5 < MIC < 1	0,5 < MIC < 1
2	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	0,5 < MIC < 1	1 < MIC < 2
3	8 < MIC < 16	8 < MIC < 16	MIC > 16	8 < MIC < 10
4	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
5	4 < MIC < 8	4 < MIC < 8	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4
6	8 < MIC < 16	1 < MIC < 2	2 < MIC < 4	2 < MIC < 4
7	4 < MIC < 8	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	0,5 < MIC < 1
8	4 < MIC < 8	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	2 < MIC < 4
9	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	0,5 < MIC < 1	0,5 < MIC < 1
10	4 < MIC < 8	0,5 < MIC < 1	2 < MIC < 4	0,5 < MIC < 1
11	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	4 < MIC < 8	0,5 < MIC < 1
12	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	0,5 < MIC < 1	1 < MIC < 2
13	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4
14	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
15	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	0,5 < MIC < 1	0,5 < MIC < 1
16	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	0,5 < MIC < 1	2 < MIC < 4
17	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	0,5 < MIC < 1	2 < MIC < 4
18	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	1 < MIC < 2
19	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
20	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4	8 < MIC < 16	1 < MIC < 2
21	4 < MIC < 8	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	1 < MIC < 2
22	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	4 < MIC < 8	1 < MIC < 2
23	2 < MIC < 4	2 < MIC < 4	0,5 < MIC < 1	1 < MIC < 2
24	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	0,5 < MIC < 1	2 < MIC < 4
25	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
26	4 < MIC < 8	1 < MIC < 2	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
27	4 < MIC < 8	1 < MIC < 2	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
28	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4
29	8 < MIC < 16	4 < MIC < 8	8 < MIC < 16	1 < MIC < 2
30	4 < MIC < 8	2 < MIC < 4	8 < MIC < 16	2 < MIC < 4

Tal y como se aprecia en la Tabla 20, La cepa número 3, fue el microorganismo con la más alta tolerancia a los diferentes metales pesados ensayados y como se puede ver las 30 cepas estudiadas presentan en general una buena tolerancia a la presencia de cobre en el medio. Aproximadamente, el 50% de las cepas presentan crecimiento a una concentración máxima de 4mM mientras que el resto, presentan crecimiento en una concentración máxima de 8mM. Pero en ninguna de las 30 cepas ensayadas se observa crecimiento por encima de dicha concentración.

En una apreciación a nivel general, se observó que la tolerancia de las cepas probadas estar en orden de $Cu > Pb > Zn > Cd$. Resultados similares fueron conseguidos por Çolak et al. quienes testó la resistencia las cepas *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus* a diversas concentraciones de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} , concluyendo finalmente que dichas cepas son altamente resistentes al cobre y al plomo.

Esto sugiere que la microbiota presente en el té de compost puede crecer en presencia de altas concentraciones de Cu sin modificación evidente en su actividad biológica tal y como indican Vullo et al. donde 5 de las 11 cepas aisladas y testadas presentaron una tolerancia destacada hacia el Cu aunque con valores de CMI inferiores situándose en un máximo de 2 mM.

El plomo presenta grandes variaciones en el total de las cepas ensayadas. Por un lado, observamos en la Tabla 20 que algunas cepas toleran la máxima concentración estudiada para este metal como ocurre en el caso de la cepa número 3 que es capaz de presentar crecimiento hasta la concentración de 16 mM, mientras que por otro lado existen un gran número de cepas que no toleran concentraciones superiores a 0.5 mM.

En general, el plomo se comporta de forma muy similar al cobre y aproximadamente el 50% de las cepas aisladas toleran concentraciones comprendidas en el rango 8 – 16 mM, lo que sugiere que la mayor parte de la microbiota presente en el té de compost puede tolerar altas concentraciones de Pb.

Alta resistencia al plomo, aunque con valores de CMI inferiores a los conseguidos en este estudio han sido obtenidos por Wang y Chen y Çolak et al. que observaron diferentes cepas microbianas, identificados como miembros del género *Bacillus*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, con tolerancia al Pb. Este comportamiento fue especialmente evidente en el caso de la cepa 3, porque este microorganismo mostró un valor de CMI superior a 16 mM, lo que confirma la alta resistencia de esta cepa bacteriana a diferentes metales pesados.

En el caso del Zinc se observa que sólo la cepa 3, presenta el máximo de crecimiento a una concentración de 8 mM. El resto de cepas presentan en su mayoría crecimiento hasta una concentración máxima de 4mM. Así, la cepa 1 y 10 son las más sensibles pues sólo presentan crecimiento a las concentraciones de 0.25mM y 0.5mM, respectivamente.

Así, el Zinc es menos tolerado por nuestras cepas respecto al cobre y plomo ya que sólo la cepa número 3 es capaz de soportar concentraciones relativamente altas del mismo. Por lo tanto los valores de MIC predominantes fueron entre 2-4 y 4-8 mM para la mayoría (85%) de los aislamientos.

En los estudios realizados por Vullo et al. se describen otras cepas procedentes de aguas residuales urbanas (*Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas veronii* y *Ralstonia taiwanensis*), con una alta tolerancia al zinc, estableciendo su CMI máximo en 12 mM, lo que sugiere que la resistencia a este metal podría ser una capacidad biológica que está relativamente extendido en el mundo microbiano.

Finalmente, cabe destacar que el cadmio fue el metal que presentó mayor toxicidad. En este sentido, se observa como la mayoría de las cepas fueron incapaces de crecer a concentraciones de Cd superiores a 4 mM. Estos resultados fueron similares a otros estudios realizados anteriormente por Karakagh et al. que aisló 3 cepas, *Bacillus* sp., *Actinomyces* sp. and *Streptomyces* sp del suelos agrícolas de Irán. Estas cepas presentaron resistencia al cadmio estableciendo sus CMI en 3.5, 4.0

and 4.0 mM respectivamente. Del mismo modo, Malik y Jaiswal (2000) indicaron que diferentes cepas de *Pseudomonas* fueron incapaces de tolerar concentraciones de Cd superiores a 1,6 mM por lo que el comportamiento de la cepa 3, es especialmente significativo ya que mostró una capacidad inusual para resistir altas concentraciones de Cd (Tabla 20), lo que sugiere que este microorganismo puede crecer en ambientes contaminados con altas concentraciones de este metal pesado.

2.3. Identificación taxonómica de las cepas con mayor tolerancia a los metales pesados ensayados

A partir de las 30 se seleccionaron las 8 cepas que mejor resistencia mostraron a la presencia de los metales pesados ensayados; Pb, Zn, Cu y Cd. La afiliación taxonómica de las cepas seleccionadas, basado en la secuenciación parcial del gen 16S-rRNA (V1 a regiones hipervariables V3), se muestran en la Tabla 21.

La comparación de secuencias con las bases de datos demostró la afiliación de la cepa 3 a *Rhodococcus sp.* (100% de identidad), la cepa 4 a *Virgibacillus sp.* (97% de identidad), la cepa 14 a *Leifsonia shinshuensis* (99% de identidad), la cepa 18 a *Achromobacter xylosoxidans* (99% de identidad), la cepa 24 a *Cupriavidus sp.* (99% de identidad), la cepa 25 a *Achromobacter sp.* (99% de identidad), la cepa 28 a *Achromobacter sp.* (99% de identidad) y la cepa 29 *Oceanobacillus sp.* (100% de identidad). Las cepas identificadas pertenecen a 6 géneros de bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas.

Tabla 21.- Afiliación taxonómica de las 8 cepas más tolerantes.

Strain	Length (bp)	Identification	Identity	Similarity (%)
3	1441	<i>Rhodococcus sp.</i> KF790905.1	1441/1441	100
4	1303	<i>Virgibacillus sp.</i> AB562922.1	1267/1303	97
14	1430	<i>Leifsonia shinshuensis</i> AB244485.1	1427/1430	99
18	1406	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> FJ169468	1370/1374	99
24	1454	<i>Cupriavidus sp.</i> DQ777737	1397/1399	99
25	1525	<i>Achromobacter sp.</i> EU272196.1	1477/1486	99
28	1477	<i>Achromobacter sp.</i> JN196540.1	1438/1439	99
29	1488F	<i>Oceanobacillus sp.</i> FR667183.1	1441/1461	100

La cepa 3, identificada como *Rhodococcus sp*, fue tal y como se ha expuesto anteriormente, la que destacó como bacteria más resistente. Así, y atendiendo a esta cuestión vale la pena recalcar que de acuerdo con los valores obtenidos, la cepa 3, *Rhodococcus sp*, se postula como una gran herramienta en el campo de la biorremediación de ambientes contaminados metales pesados. Así pues, y siguiendo esta misma premisa, varios autores han testado la capacidad de distintas cepas de *Rhodococcus* para metabolizar compuestos contaminantes. En este contexto, se han descrito cepas de *Rhodococcus* (Van der Geize y Dijkhuizen, 2004) con la capacidad de catabolizar una amplia gama de contaminantes ambientales nocivos, tales como tolueno, naftaleno, los herbicidas y los bifenilos policlorados.

Coincidiendo con estos resultados, de Carvalho y da Fonseca (2005) y de Carvalho (2009) demostraron que *Rhodococcus erythropolis* tiene una gran capacidad para degradar alcanos y alcoholes, Sorkhok et al. (1994) encontraron gran cantidad de células de *Rhodococcus sp*. en ambientes contaminados con petróleo. Dichas células mostraron posteriormente en un estudio en el laboratorio la habilidad de degradar estos hidrocarburos. Vojtková et al. (2012) usaron una cepa de *Rhodococcus sp*. para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la industria textil. Estas aguas contenían iones metálicos tóxicos (Cu, Cd, Ni, Pb, Cr) derivados de los tintes utilizados en procesos de teñido y pigmentación de los tejidos. Los resultados adquiridos implican que la cepa bacteriana *Rhodococcus sp*. tiene un potencial significativo en la eliminación o recuperación de los contenidos de metales tóxicos en las aguas residuales testadas.

Por otra parte, se ha estudiado este microorganismo por tener una mayor resistencia a diferentes metales pesados tales como Cd y Cr, lo que sugiere el género *Rhodococcus* pueden ser útiles para la biorremediación de sitios contaminados con altas concentraciones de ellos (Fleck et al., 1999 y Belimov et al., 2004).

Para continuar y completar el estudio filogenético de las 8 cepas seleccionadas como más resistentes se construyó el árbol filogenético correspondiente (Figura 26) que muestra que la mayoría de las poblaciones identificadas resultaron estar evolutivamente relacionadas con el grupo beta-Proteobacteria (cuatro cepas). Dos de las cepas se incluyen en el orden Firmicutes y se relacionaron con bacilos. Las dos restantes se incluyen en el grupo Actinobacteria. De acuerdo con nuestros resultados, el grupo dominante de bacterias resistentes a metales pesados fue el de Proteobacterias. Las bacterias pertenecientes a este grupo suponen una parte importante dentro de la comunidad bacteriana presente en el compost, donde los miembros de beta y alfa-proteobacterias son responsables mayoritarios de los procesos de biodegradación de la materia orgánica durante el proceso de compostaje.

Resultados similares se obtuvieron por parte de Vullo et al. (2008) quienes llevaron a cabo un estudio para la búsqueda de microorganismos resistentes a metales pesados procedentes de ambientes contaminados del Área Metropolitana de Buenos Aires. Tras someter a los microorganismos a la presencia de Cu, Cd y Zn se aislaron 5 cepas todas de ellas correspondientes al filo Proteobacteria (3 gamma-proteobacterias y 2 beta-proteobacterias). De igual modo Hassen et al. (1997) aislaron 25 cepas resistentes a metales pesados a partir de diversos ambientes naturales contaminados, de las cuales 20 eran miembros de filo proteobacteria mientras que las restantes se identifican como Firmicutes. Por su parte, Sandaa et al. (1999) estudiaron las poblaciones microbianas presentes en dos suelos contaminados en mayor o menor medida con metales pesados, obteniendo igual que en los casos anteriores una mayor cantidad de bacterias del filo Proteobacteria.

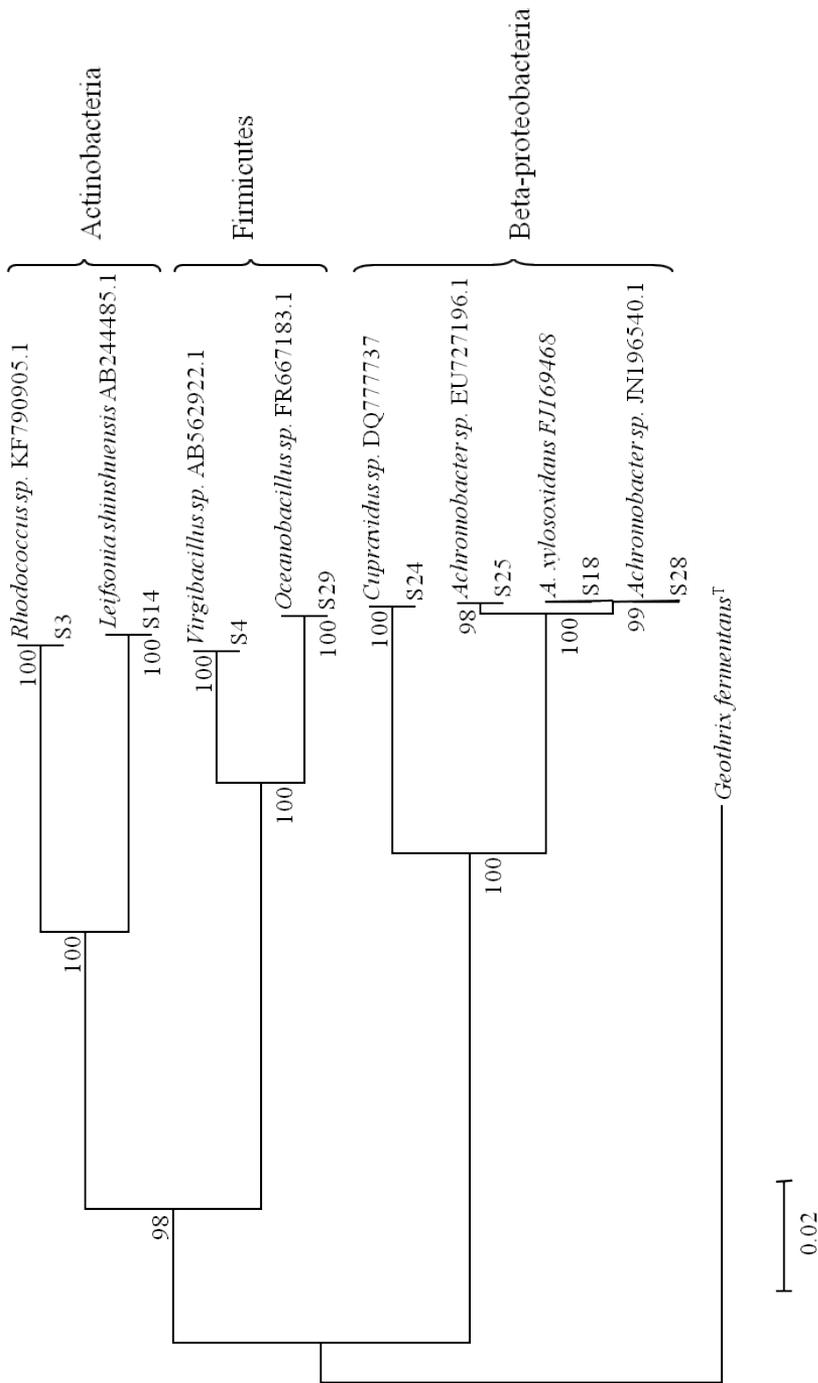


Figura 26.- Árbol filogenético Neighbour-Joining basado en la secuencia parcial del gen codificante del ARNr 16S (mínimo 800 bp), mostrando las posiciones de las secuencias de las 8 cepas analizadas en este estudio, y aquellas de mayor porcentaje de identidad depositadas en la base de datos.

2.4. Estudios de eliminación de Cu, Cd, Pb y Zn por parte de *Rhodococcus sp.*

Los resultados de la CMI obtenidos, revelaron que *Rhodococcus sp.*, (cepa 3), fue la bacteria más tolerante a la presencia de Cd, Zn, Pb y Cu. Por esta razón, se quiso testar la capacidad de eliminación de dichos metales pesados por parte de *Rhodococcus sp.*

Para ello, dicha cepa se puso en contacto en medio LPM líquido modificado con Zn, Pb y Cu a una concentración de 8 mM, y Cd a una concentración de 4 mM. Se sabe que la biosorción depende en gran medida el valor de pH; por consiguiente, este parámetro se controla cuidadosamente a lo largo de los experimentos.

La Figura 27 muestra que *Rhodococcus sp.* fue capaz de eliminar diferentes cantidades de los metales pesados ensayados. La eliminación máxima se produjo con el Pb, para el que se observó una reducción superior al 63%. En lo referente al Cu y Zn se retiraron también un 43,35 y 27,95%, respectivamente, si bien se eliminó sólo el 12% de Cd.

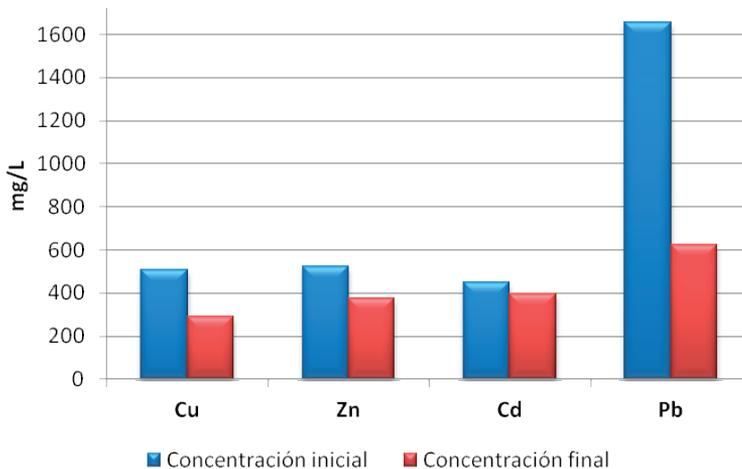


Figura 27.- Gráfico que muestra la cantidad inicial y final de Cu, Zn, Cd y Pb tras 24 horas de incubación, en medio LPM modificado e inoculado con *Rhodococcus sp.*

Estos porcentajes son comparables con los resultados reportados anteriormente por otros investigadores (Ahluwalia y Goyal (2007); Gisset et al. (2007); Bueno et al. (2008) y Vullo et al. (2007)). Destacar los resultados obtenidos por Vullo et al. (2007) que observaron una eliminación por parte de *P. veronii* de Cu del 35% más del 40 % de Cd y 41 % de Zn. Sin embargo, en nuestro estudio, cabe señalar que la eliminación de los cuatro metales pesados fue producida por la misma cepa bacteriana, mientras que en otros casos, fueron diferentes microorganismos los que se utilizaron para cada metal pesado. Desde nuestro punto de vista, esto aumenta la importancia de *Rhodococcus sp.* (cepa 3) aislada y seleccionada en nuestros experimentos como una cepa con un alto potencial en biorremediación.

Para comprender mejor la interacción entre *Rhodococcus sp.* (cepa 3) y los diferentes metales pesados ensayados, se realizó un análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La Figura 29 muestra imágenes de las células de *Rhodococcus sp.* (cepa 3) cultivadas en presencia de Cu (A), Cd (B), Zn (C) y Pb (D).

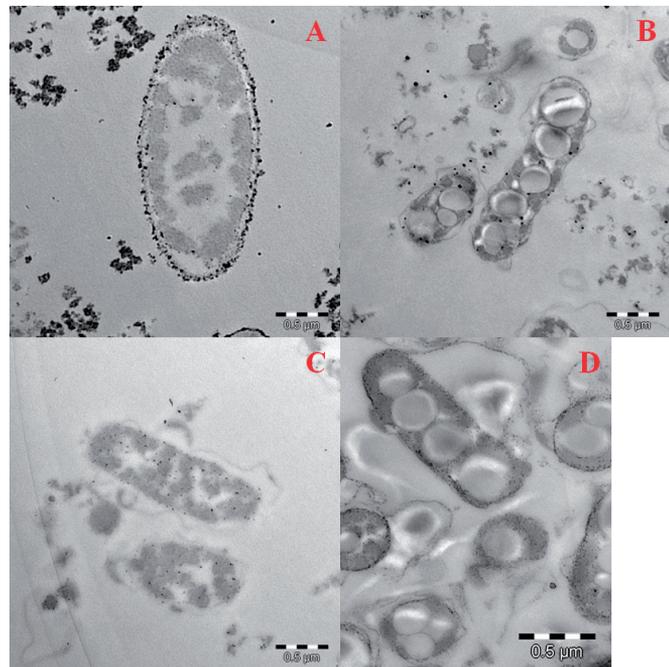


Figura 28.- Fotografía tomada a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de *Rhodococcus sp.* (cepa 3), creciendo en presencia de 8 mM de cobre (A), 4 mM de cadmio (B), 8 mM de zinc (C) y 8 mM de plomo (D).

Los resultados obtenidos sugieren que el Cu se depositó principalmente en las estructuras de la superficie celular, aunque también se detectaron pequeñas cantidades de Cu en el interior de las células de *Rhodococcus sp.* Sin embargo, cuando el microorganismo se hizo crecer durante 24 horas en medios de cultivo que contienen Cd (Figura 28B), la mayor parte del metal detectado se observó dentro de las células, coincidiendo este comportamiento con el observado en presencia de Zinc y finalmente, el análisis TEM mostró que el Pb se deposita tanto en las estructuras externas como en el interior de la bacteria, lo que sugiere procesos bioacumulativos de estos metales pesados en nuestra cepa (Figura 29).

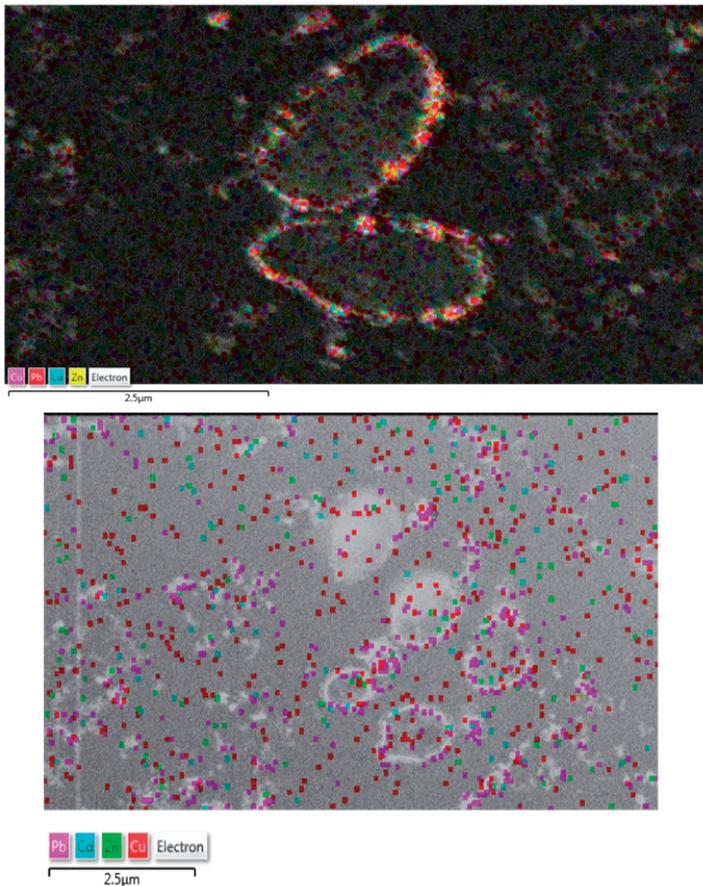


Figura 29.- Fotografías tomada a través de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de *Rhodococcus sp.* (cepa 3), creciendo en presencia de una mezcla de 2 mM de cobre, 2 mM de cadmio (B), 2 mM de zinc y 2 mM de plomo.

Coincidiendo con nuestros resultados, en experimentos para estudiar la aplicabilidad de los sistemas de lechos sumergidos para la eliminación de metales pesados, (Vílchez et al., 2008), se observó como el cobre se deposita principalmente en el exopolímero en el que están inmersas las bacterias presentes en el sistema, mientras que en el interior de las mismas, no se detecta este metal. En este mismo trabajo, también se describe la presencia de plomo tanto en la pared celular de los microorganismos como en el citoplasma bacteriano.

3. VALORACIÓN DEL POTENCIAL FERTILIZANTE DEL TÉ DE COMPOST MEDIANTE ENSAYOS CON MICROCOSMOS EDÁFICOS.

En este apartado se van a exponer y discutir los resultados obtenidos durante el experimento en microcosmos edáficos, generados a partir de un suelo agrícola destinado a cultivo de olivar en secano, a los que se les ha añadido cantidades variables de té de compost y de agua.

El experimento tiene como objetivo analizar las variaciones en las propiedades químicas, físico-químicas, microbiológicas y contenido en metales pesados (**variables del sistema edáfico**), en función de 3 variables independientes (**variables de ensayo**). La primera de estas últimas variables es la pauta de riego (cantidades de té y/o agua añadidas), la segunda es la temperatura de incubación (21 °C o 35 °C) y la tercera, el tiempo transcurrido desde el inicio del experimento (4, 8, 15, 30, 45, 60 y 90 días).

El primer aspecto que se va a discutir son las cantidades y pautas de riego con té de compost y agua según el tratamiento, tal y como se describe en “material y métodos” de esta memoria. A continuación se analizará la evolución de las variables del sistema edáfico durante el ensayo y finalmente se realizará un estudio comparativo del potencial fertilizante del té de compost con otros biofertilizantes utilizados en la agricultura como enmiendas agrícolas.

3.1. Cantidades y distribución temporal de las adiciones de té de compost

Las Figuras 30a a 30d muestran las cantidades de agua y/o té de compost añadidas a los microcosmos a lo largo de los 90 días que dura la experiencia. Se puede observar como las cantidades de líquido añadidas son muy inferiores cuando las macetas se incuban a temperatura ambiente, ya que, por regla general, los riegos se hacen cada 10-12 días, independientemente de que se adicione agua o té. Estos tiempos se reducen a la mitad cuando la temperatura de trabajo es de 35 °C, apreciándose un fenómeno destacado, no explicable, en los primeros 10 días en los que se hace necesario agregar agua o té cada 3 días.

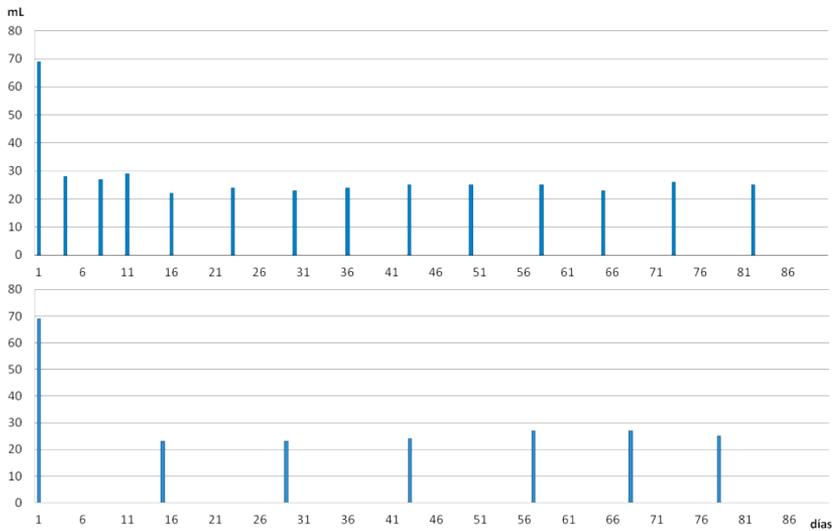


Figura 30a.- Tratamiento A: riego con agua. Cantidades y distribución temporal a 35°C (superior) y 21°C (inferior)

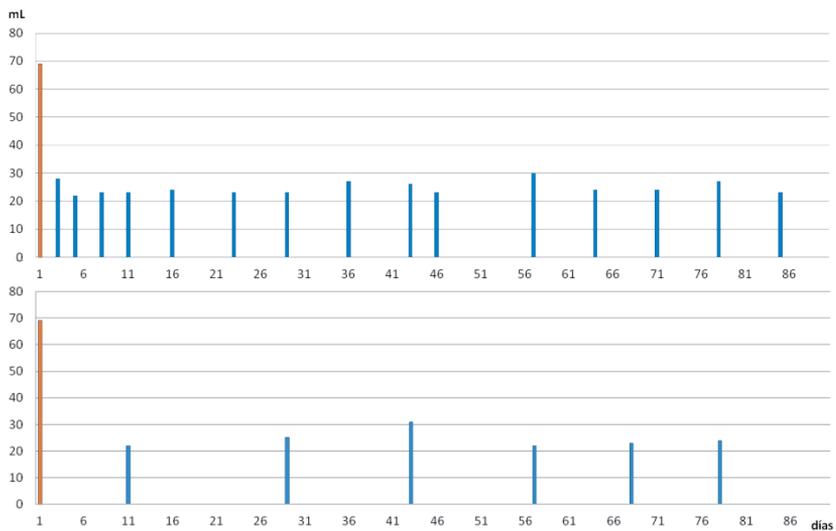


Figura 30b.- Tratamiento B: riego con agua (azul) y té de compost (marrón). Cantidades y distribución temporal a 35°C (superior) y 21°C (inferior)

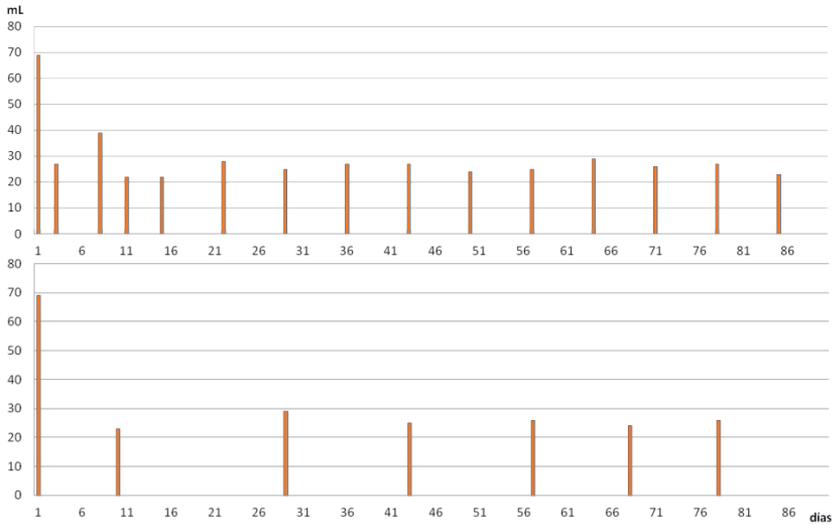


Figura 30c.- Tratamiento C: riego con té. Cantidades y distribución temporal a 35°C (superior) y 21°C (inferior)

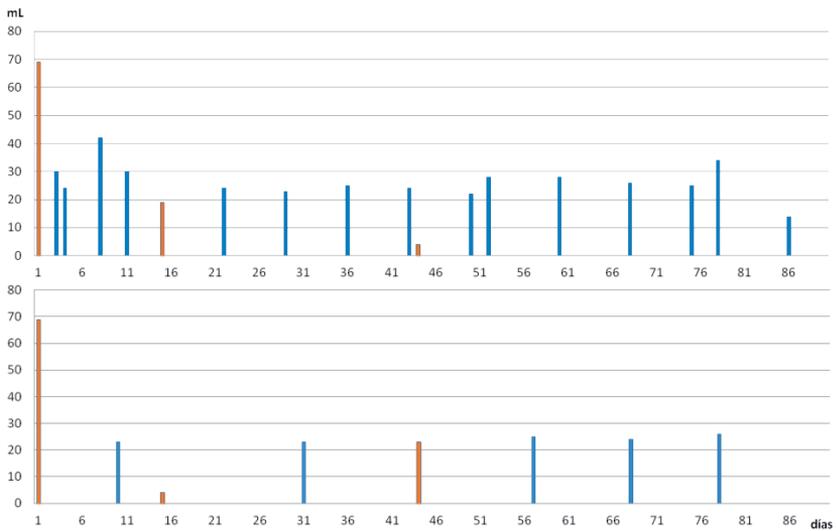


Figura 30d.- Tratamiento C: riego con agua (azul) y té de compost (marrón). Cantidades y distribución temporal a 35°C (superior) y 21°C (inferior)

3.2. Evolución de los microcosmos edáficos ensayados

La discusión de los resultados obtenidos en este experimento es muy compleja debido al elevado número de variables dependientes e independientes que se manejan (en total 39). Es por ello que la discusión de este apartado se basa en los resultados de un amplio estudio estadístico. Se comienza con una exposición de los datos de acuerdo con un estudio estadístico descriptivo, se continúa con una exposición y discusión en relación a los resultados de un estudio de las relaciones entre variables, tanto del sistema edáfico como de las variables de ensayo, de acuerdo a un análisis factorial, de la varianza y discriminante. Finalmente, se analizan las relaciones entre variables, pero para cada uno de los cuatro tratamientos de riego ensayados.

3.2.1. Datos estadísticos descriptivos

Se analizan 39 variables en 56 muestras de microcosmos, material resultante de cuatro tratamientos de adición de té de compost (A, B, C, D), siete tiempos de muestreo (4, 8, 15, 30, 45, 60 y 90 días) y dos temperaturas estándar (21 °C y 31 °C) más el suelo original (0). Las Tablas 22a a 22c muestran cada una de las variables cuantitativas, algunos parámetros de estadística descriptiva como resumen de la tendencia central, la variabilidad y algunos datos sobre la forma de la distribución estadística de los datos.

Los coeficientes de variación, que se sitúan el entre 1% y 113%, reflejan la coexistencia de variables con una escasa desviación respecto a su valor medio, mientras que otras tienen una extrema variabilidad. Los menores coeficientes fueron para pHagua, pHCIK y carbonatos, que tienen una variación menor del 5% en las 57 muestras analizadas. El resto de propiedades químicas del suelo registraron coeficientes entre 11,3% del K asimilable y 50,7% para el N, reflejando cambios importantes con el desarrollo experimental.

Las enzimas fosfatasas ácida y básica y arisulfatasa variaron entre 12,5% y 33,6%, mientras que la cantidad de bacterias mesófilas aerobias (UFC/gr) registró un coeficiente de variación mucho mayor, próximo al 82%. Es necesario sin embargo, puntualizar que este último dato no refleja la realidad del sistema debido a que la variación en el número de bacterias aerobias mesófilas a nivel práctico no es relevante mientras que desde un punto de vista estadístico sí lo es.

En el conjunto de metales pesados asimilables, algunos con valores no determinados ($n < 57$), la variabilidad de los datos está alrededor del 20% (intermedia), excepto casos extremos como In y Sn (muy alta variabilidad) y Ba (baja variabilidad).

De particular interés resultan también los estadísticos skewness y kurtosis. Valores fuera del rango de -2 y +2 indican sesgos en la distribución de normalidad, que pudieran estar indicando coexistencia de datos en la misma variable correspondientes a poblaciones diferentes.

Tabla 22a.- Estadística descriptiva de los parámetros físicoquímicos

	mL agua	mL té	mL total	pH _{agua}	pH _{Clk}	CE	CaCO ₃	C.O.	N	P	K
Muestras	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Media	93,1228	81,5088	174,632	8,00175	7,48947	739,368	40,3771	0,890351	0,0754912	23,7999	382,551
DE	104,859	81,2241	102,955	0,104354	0,0919709	284,965	1,77626	0,144085	0,0382954	8,76812	43,2151
Min	0	0	0	7,8	7,4	363	36,82	0,64	0,38	3,02	319,7
Max	372	420	456	8,4	7,9	1968	45,5	1,25	0,289	45,04	478,88
Rango	372	420	456	0,6	0,5	1605	8,68	0,61	0,251	42,02	159,18
Stnd. Skewness	3,78084	6,09169	3,14816	2,90077	5,50098	5,1651	1,94112	2,01109	10,7599	0,156871	2,50376
Stnd. Kurtosis	1,32176	8,49625	0,819229	4,64591	9,17991	7,43786	0,409885	-0,639152	25,9234	-0,783517	-0,331656
Coef. de variación	112,63	99,6508	58,9553	1,30414	1,228	38,5416	4,39918	16,183	50,7283	36,841	11,2966

Tabla 22b.- Estadística descriptiva de los parámetros biológicos

	UFC gr ⁻¹	F. Ácida	F. Básica	Arilsulfatasa
Muestras	57	57	57	57
Media	660246	40,1641	192,929	14,804
DE	542339	12,1493	24,1413	4,97406
Min	74000	13,485	69,364	3,886
Max	2,70E+06	85,636	228,394	24,982
Rango	2,63E+06	72,151	159,03	21,096
Stnd. Skewness	7,34432	3,07116	-6,77978	-0,0335893
Stnd. Kurtosis	8,53779	4,93091	17,135	-0,248102
Coef. de variación	82,1421	30,2491	12,513	33,5994

Tabla 22c.- Estadística descriptiva de los metales pesados asimilables

	Be	Sc	V	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	As	Y
Muestras	36	55	56	56	56	56	56	56	56	56	55
Media	0,0157778	5,41991	83,9688	157,587	4492,88	36,397	300,946	4508,78	156,6	24,5682	56,4715
DE	0,0102431	1,17375	14,4575	39,2733	932,103	9,35268	48,4609	983,887	54,2184	4,51143	7,29525
Min	0,008	0,458	19,948	6,558	2469,91	20,958	154,398	2502,68	51,336	5,134	30,718
Max	0,048	7,528	110,958	227,408	6868,15	70	530	10990	420	50	69,798
Rango	0,04	7,07	91,01	220,85	4398,24	49,042	375,602	8487,32	368,664	44,866	39,08
Stnd. Skewness	3,64588	-3,55267	-4,01977	-2,65201	1,45217	4,85903	4,36545	15,9261	7,02203	5,79884	-2,25945
Stnd. Kurtosis	2,40972	6,84041	8,84531	4,11604	0,613252	4,60384	13,7548	54,0987	14,889	37,1636	2,69616
Coef. de variación	64,9209	21,6563	17,2177	24,9217	20,7462	25,6963	16,1361	21,8216	34,6221	18,3629	12,9185
	Mo	Cd	In	Sn	Sb	Ba	Tl	Pb	Bi	Th	U
Muestras	56	56	54	51	56	56	55	56	55	55	55
Media	2,03643	7,72196	0,0104074	33,4713	12,1752	3318,73	0,0838182	1195,71	2,07673	1,98773	0,629636
DE	0,58371	3,92927	0,0046318	28,2539	1,75462	308,798	0,0179445	249,499	0,293712	0,404219	0,175455
Min	0	4,08	0,008	0,058	3	1537,87	0,038	607,104	1,334	1,08	0,298
Max	4,088	19,43	0,028	134,738	15,158	4580	0,128	2692,07	2,984	3,71	1,138
Rango	4,088	15,35	0,02	134,68	12,158	3042,13	0,09	2084,97	1,65	2,63	0,84
Stnd. Skewness	0,876818	6,2137	5,49228	4,89816	-9,92191	-7,0157	0,117459	12,5759	2,72502	7,02854	2,37887
Stnd. Kurtosis	6,55381	4,45091	4,21981	4,94917	22,9919	38,1165	-0,0446227	37,3517	3,65821	13,2159	0,573536
Coef. de variación	28,6634	50,8843	44,5048	84,4122	14,4114	9,30472	21,4088	20,8662	14,143	20,3358	27,866

3.2.2. Relación entre las variables de ensayo y del sistema edáfico

En la Tabla 23 (anexo) se recogen los coeficientes de correlación significativos ($P < 0,05$) entre todas las variables empleando la totalidad de los datos experimentales. Las correlaciones, aunque significativas, tienen bajos coeficientes, especialmente aquellos entre propiedades químicas, fisicoquímicas y biológicas del suelo, donde sólo algunos coeficientes son mayores de 0,60.

Aparte de las relaciones aparentemente obvias entre días y cantidad de riego (mL agua, mL té o mL totales), destacan la relación existente entre los días y la fosfatasa básica ($r = 0,71$), entre el aumento de CE y la cantidad de riego total ($r = 0,63$) y la relación inversa entre arisulfatasa y temperatura ($r = -0,63$), que indica una mayor formación de esta enzima a 21°C que a 35°C .

Los metales pesados asimilables tienen un mayor número de correlaciones y con más altos coeficientes, mostrando una especial covarianza entre sí. A excepción del Be, Cd, In y Sn, el resto muestran bastante correlación entre ellos. Los coeficientes oscilan entre 0,99 (Sc-Cr) y 0,27 (Cr-Ba). Hay también un gran número de correlaciones entre el contenido de diversos metales y otras variables, tal como Cr-CE ($r = 0,47$) y Co-Arisulfatasa ($r = -0,62$). Destaca, sin embargo, que el sentido de estas correlaciones en una misma variable, por ejemplo días, es positiva para un conjunto de metales y negativa para otro grupo de metales.

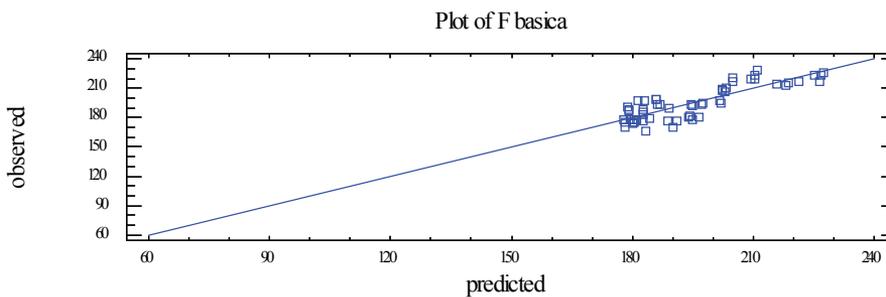
Se han probado además, modelos de regresión lineal múltiple para cada variable (excepto en los metales, que sólo se han testado con Sc y Mn). Aquellos que resultan significativos ($P < 0,05$) se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24.- Ecuaciones de regresión para el total de datos

Variable de Y	Coeficiente de las variables independientes					Estadísticos			
	ordenada en el origen	DÍAS	T ^a	mL agua	mL té	R ²	R ² ajustada	SEE	P-value
CE	244,066	4,15984	7,54865	0,124358	1,53759	55,5286	52,0407	197,257	0
UFC	430112	1139,62	24236,2	3161,68	2161,82	17,8558	11,4132	326081	0
F. Básica	182,847	0,591005	-0,101839	-0,030143	-0,0395193	71,4443	69,2046	9,78381	0
Arilsulfatasa	24,3842	0,0489959	-0,249957	-0,0240633	-0,0226677	43,1565	38,6982	3,7738	0
Sc	6,04317	0,0025609	-0,069455	0,00427625	0,010002	41,0932	36,3807	0,936205	0
Mn	6974,46	-39,1989	-85,4433	7,95538	6,30453	47,3218	43,1076	694,409	0

En la Figura 31 se muestra como ejemplo, por ser la de mayor R², la gráfica donde se representan los datos de fosfatasa básica predicha mediante la ecuación:

Arilsulfatasa (unidad) = 24,3842 + 0,0489959 x días - 0,249957 x T^a - 0,0240633 x ml agua - 0,0226677 x ml té frente a la fosfatasa básica observada. La linealidad de los puntos y su ajuste a la recta, indican una muy buena correlación.

Figura 31.- Gráfico de correlación para la F. Básica (mayor R²)

Posteriormente discutiremos el sentido de todas las relaciones mencionadas.

3.2.3. Estudio de la variabilidad de los sistemas edáficos ensayados mediante análisis factorial

Con objeto de clarificar las relaciones y buscar la combinación de variables que mejor explica la variabilidad de nuestros datos, se ha realizado un análisis factorial eliminando las variables linealmente dependientes (mL agua totales) o con un escaso número de determinaciones (Be). La resolución del mismo establece 9 factores con eigenvalue mayor de 1 (Figura 32), teniendo el resto una escasa influencia en el sistema experimental ensayado. Estos 9 factores principales explican el 81,1% de la variabilidad total de los datos (Tabla 25). Este porcentaje es suficiente y elevado, teniendo en cuenta que los microcosmos edáficos son sistemas biológicos.

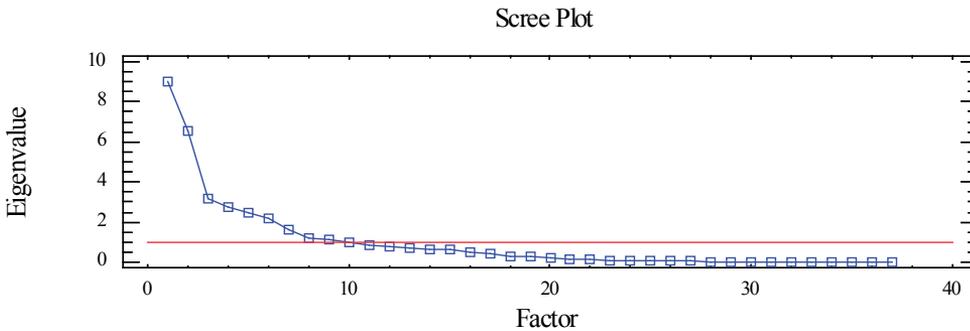


Figura 32.- Valores del eigenvalue del análisis factorial

Tabla 25.- Análisis factorial del total de variables

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9
Días	-0,6025	0,6349	-0,0345	-0,3193	-0,2056	0,0276	-0,0233	-0,0093	0,0155
Tª	-0,2379	-0,0482	-0,7926	-0,1034	0,0754	0,0769	0,0620	-0,0490	0,0852
mL agua	-0,2445	0,1157	-0,3450	-0,7945	-0,0404	0,0755	-0,2075	-0,0308	-0,0312
mL té	-0,3613	0,5091	-0,1693	0,6072	-0,1302	0,0197	0,2936	-0,0428	0,0766
pH agua	0,1291	0,0425	0,0674	-0,0922	0,6526	-0,3261	-0,1333	0,1301	-0,1025
pH cloruro	0,0224	0,0718	-0,0211	0,0096	0,8432	-0,0455	-0,2088	-0,0032	-0,1046
CE	-0,3050	0,6363	-0,4552	0,0944	-0,0197	0,1718	0,0225	0,0213	-0,1458
Carbonatos	-0,0984	-0,1861	0,0771	-0,1729	-0,0147	-0,0585	-0,0570	-0,0096	-0,7646
C orgánico	0,0597	0,0405	0,0886	0,0641	0,1314	-0,7794	0,0306	-0,2362	-0,0117
N	0,0010	-0,1921	0,2614	-0,0998	-0,2009	0,0993	-0,3022	-0,0088	0,6341
P	0,0771	0,2267	0,0493	0,5707	0,0494	0,4946	-0,2342	-0,1176	0,1911
K	0,2103	-0,2340	0,0996	0,0412	0,1247	0,5997	-0,1636	-0,0937	0,3919
UFC	-0,0303	-0,4351	-0,0277	0,4685	-0,3167	-0,1838	-0,2587	-0,1140	-0,3560
F Ácida	-0,0479	0,1260	0,1669	-0,0346	-0,6757	-0,2805	-0,2048	0,0437	-0,1637
F Básica	-0,4804	0,6250	0,2557	-0,2603	-0,0500	0,0200	-0,0562	-0,0498	0,0912
Arisulfatasa	0,1033	0,0058	0,8762	0,0775	0,0126	-0,0914	0,0342	0,0059	0,1533
Sc	-0,0932	0,9106	0,2183	0,1084	0,0480	-0,1510	-0,0433	-0,0603	-0,0723
V	-0,0771	0,9516	0,0878	0,1132	0,0376	-0,1091	-0,0678	-0,0985	-0,0453
Cr	-0,0118	0,9155	0,1586	0,1334	0,0604	-0,1466	-0,1059	-0,1098	-0,0816
Mn	0,9268	-0,1880	0,0148	0,0777	-0,1487	0,0297	0,0184	0,0231	0,0257
Co	0,8747	-0,1138	0,0616	0,2074	-0,1611	-0,0028	-0,0112	-0,0418	-0,0640
Ni	0,8541	0,1475	0,3200	0,2215	0,1517	-0,1418	-0,0090	0,1051	-0,0749
Cu	0,8998	0,0749	0,1769	-0,0808	0,0852	0,1570	-0,0584	0,1674	0,1350
Zn	0,6272	-0,0844	-0,0623	-0,1808	0,0931	-0,2023	0,5509	0,1057	0,1238
As	0,6277	0,6937	-0,1080	0,0380	0,0730	0,1156	0,0989	0,0314	0,1750
Y	0,8891	-0,1256	0,2353	-0,1608	0,2005	0,0622	-0,0283	0,1450	0,0771
Mo	0,0962	0,5625	-0,1636	0,5903	-0,1994	0,0930	0,3837	0,0860	0,1470
Cd	-0,1047	0,2207	0,5720	0,1426	0,2188	0,4491	0,1579	-0,1407	-0,1122
In	0,1696	-0,1554	0,0594	0,0456	0,0565	0,0927	0,0134	0,8668	-0,0533
Sn	0,0453	0,0188	0,0585	0,1404	-0,1368	-0,0251	0,6126	0,0507	-0,1210
Sb	0,1336	0,7708	-0,2088	-0,1481	-0,1149	0,2634	0,2416	-0,0799	0,2208
Ba	0,6548	0,6689	0,0951	-0,0679	0,0693	0,0281	-0,0247	0,0490	0,1608
Tl	0,3662	0,1639	0,6938	-0,1477	-0,2393	0,1289	0,0198	0,3420	0,0580
Pb	0,4273	0,0600	-0,2085	-0,4317	-0,1611	0,4322	0,1823	-0,1826	-0,0587
Bi	0,7093	-0,0438	0,1495	0,0797	-0,0229	0,0291	0,2443	0,4744	0,1555
Th	0,5557	-0,1414	0,0945	-0,1960	0,0537	-0,0812	0,4110	0,5725	0,1008
U	0,0661	-0,2475	0,0729	-0,3008	0,3528	0,0570	0,2046	-0,0954	-0,0136
% varianza explicada	24,41	17,71	8,52	7,37	6,67	5,84	4,37	3,25	2,97
% varianza explicada acumulativa	24,41	42,12	50,64	58,01	64,68	70,52	74,89	78,14	81,11

Tanto el factor 1 como el 2, respectivamente con un porcentaje de varianza explicada del 24,4 y 17,7, tienen como variable altamente cargada los días de incubación (-0,602 y 0,635). Ambos factores, por tanto, podrían etiquetarse como factores “tiempo de incubación”.

Las variables de mayor carga en los factores 1 y 2 son los metales pesados asimilables, pero mientras que el factor 1 agrupa un conjunto de metales encabezados por el Mn, como variable de mayor carga (0,927) en relación inversa con los días, el factor 2 contiene otro grupo de metales representados por el V (0,951) relacionados de forma positiva con los días. Otras variables de menor carga (entre 0,238 y 0,625) relacionadas con el tiempo de incubación, son temperatura, mL agua, mL té, CE, fosfatasa básica y UFC gr-1, ésta última en sentido inverso.

El factor 3 es claramente un factor “temperatura” ($T=-0,792$), que como ya se ha indicado anteriormente está inversamente relacionado con la producción de arisulfatasa (0,876). Otras variables de menor carga en este tercer factor son mL agua y CE, los cuales se incrementan con la temperatura, y algunos metales no incluidos en los grupos anteriores. Entre ellos, el contenido de Tl parece especialmente favorecido a 35°C.

El factor 4 podría representar al “riego”, con la relación inversa entre mL de agua (-0,795) y mL de té (0,607) adicionados. Se observa que las cantidades de té se relacionan positivamente con el contenido de P, el recuento de UFC, Y y negativamente con el Pb.

El resto de factores parecen más vinculados a las propiedades fisico-químicas y químicas del suelo. El factor 5, que explica el 6,7% de varianza e incluye a las variables pHagua (0,652) y pHCIK (0,843), podría denominarse factor “reacción del suelo”. La actividad fosfatasa ácida (-0,676) y UFC (-0,317) son otras variables que destacan por cargarse sobre este factor, indicando que la disminución de pH se corresponde con una mayor actividad microbiana y en especial, con la formación de fosfatasa ácida.

El factor 6 podría denominarse factor “carbono orgánico” ya que esta variable es la de mayor peso en él. La causa de la variabilidad del C.O.

es en parte experimental porque las adiciones de té planificadas incrementan levemente su cantidad. Por otro lado, las variables asociadas (pHagua, P y K) y el sentido de las relaciones con el C.O. (directo en el caso del pHagua e inverso en P y K), podría estar indicando liberación de P y K y bajada del pH en el transcurso de la degradación de la materia orgánica. Discutiremos más adelante el sentido de estas relaciones

Los factores 7 (4,4% de varianza) y 8 (3,2% de varianza), recogen a “metales” (Sn, In) con escasa carga en los factores anteriores. Su contenido es bastante independiente de aquellos otros metales previamente agrupados en los factores 1 y 2, pero algo influyente en la variabilidad del sistema.

Finalmente, el factor 9, agrupa a las variables “carbonatos y N”, que muestran una relación inversa. Discutiremos más adelante el sentido de esta relación.

Con objeto de reducir las 39 variables a un pequeño conjunto que significativamente contengan información del resto, se realizaron análisis factoriales independientes para las propiedades químicas y fisicoquímicas, biológicas y metales pesados asimilables.

a) Propiedades químicas y fisicoquímicas

Los factores significativos (cuatro) del análisis de las propiedades químicas y fisicoquímicas del sistema edáfico ensayado, explicaron menos varianza (65% acumulada) y las cargas de las variables en los factores fueron sensiblemente más bajas (Tabla 26). Aún así, la variable “mL de té” contiene información de CE, N y K (factor 1); “mL de agua” representa bien a los días, temperatura, y también en parte a CE (factor 2); el P es una estimación significativa de “carbonatos” (factor 3) y pH_{ClK} del pH_{agua} (factor 4).

Tabla 26.- Análisis factorial de las propiedades químicas y fisicoquímicas

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Días	0,298231	0,675774	-0,173682	-0,360864
T ^a	0,12258	0,572117	0,189329	0,230586
mL agua	-0,264815	0,819503	-0,421941	0,043044
mL té	0,729002	0,0170516	0,505968	-0,29008
pH_{agua}	0,0308416	-0,0152235	-0,165226	0,810813
pH_{ClK}	0,0877168	-0,00979137	0,114028	0,873521
CE	0,601155	0,571697	0,286158	-0,123549
Carbonatos	0,0545427	-0,0309403	-0,597492	0,128277
CO	0,388744	-0,474372	-0,312256	0,195387
N	-0,635664	0,00611745	0,117821	-0,201507
P	-0,0226218	-0,0207527	0,793584	0,184179
K	-0,621586	-0,0687358	0,463014	-0,0764412
% varianza explicada	19,859	16,788	15,928	12,506
% variación explicada acumulativa	19,859	36,647	52,575	65,081

b) Propiedades biológicas

Considerando sólo las variables biológicas aparecen dos factores que explican el 69% de la varianza del sistema (Tabla 27). El factor 1 nos indica la relación positiva entre la fosfatasa básica, la arilsulfatasa y en menor medida con la fosfatasa ácida. El factor 2 indica la relación positiva entre la UFC y la fosfatasa ácida. Estas relaciones se discutirán más adelante.

Tabla 27.- Análisis factorial de las propiedades biológicas

	Factor 1	Factor 2
UFC gr ⁻¹	-0,198057	0,881017
F Ácida	0,459875	0,675899
F Básica	0,841875	-0,116181
Arisulfatasa	0,747965	0,12364
% varianza explicada	39,319	30,178
% varianza explicada acumulativa	39,319	69,498

c) Metales pesados asimilables

El análisis factorial para los metales pesados asimilables (Tabla 28 y Figura 33) indica que 5 factores explican el 80% de la varianza del sistema ensayado. Los factores 1 y 2 son los que más varianza explican (36% y 23% respectivamente) y agrupan a la mayor parte de los metales pesados asimilables estudiados.

El factor 1 indica que el contenido de Mn, es una medida significativa del contenido en Co, Ni, Cu, As, Zn, Y, Bi y U. El factor 2 señala que el Sc, V y Cr están muy relacionados y representan al Sb, al Ba y al As y en menor medida al Mo y al Cd. No obstante, la posición del As y del Ba refleja un reparto de carga similar en los factores 1 y 2 (Figura

33), y por tanto una indecisión en la asignación a uno u otro factor. El factor 3 agrupa al In, Tl, Th y en menor medida al Bi, Cd, Y y Cu; el factor 4 corresponde casi en exclusiva al Pb aunque el Sb, Zn, As, U, Cu e Y también tienen cierta carga y se relacionan positivamente con el anterior. El factor 5 incluye al Sn y Mo directamente relacionados y se relacionan también el Zn, Cd, Th, Sb y Bi. El Mo tiene cargas similares en los factores 2 y 5 y en Sb en los factores 2 y 4. Sobre estas relaciones no hay demasiada información en la bibliografía y solamente el caso del Mn con el Cu está descrito por Adriano (2001).

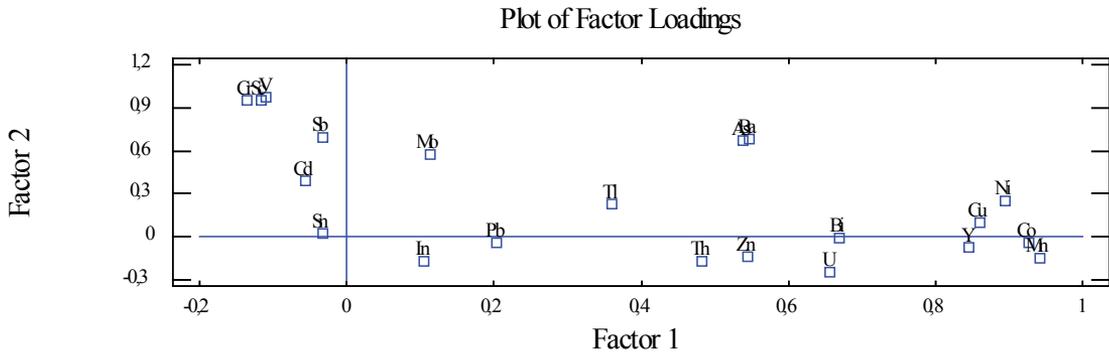
Destaca, que exceptuando al Cd en el factor 5, los metales pesados que se relacionan en los mismos factores lo hacen siempre de manera positiva, es decir, la asimilabilidad de unos es directamente proporcional a la asimilabilidad de aquellos con los que están relacionados.

En suma, para la consideración de las tendencias de los metales pesados en el ensayo de microcosmos, podemos reducir las 21 variables de metales consideradas en este análisis a Mn y Sc o V, ya que ambos presentan una cohorte de metales ligados. No obstante, el In, Pb, y Sn no muestran conexiones significativas con otros metales por lo cual deben ser considerados de manera independiente; de estos tres metales consideraremos el Pb por ser el de mayor importancia en la contaminación ambiental.

Tabla 28.- Análisis factorial de los metales pesados asimilables

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
Sc	-0,115605	0,956587	0,0263002	-0,103925	-0,0308466
V	-0,109465	0,971347	-0,080831	-0,0387026	-0,00277173
Cr	-0,135433	0,955252	-0,0639281	-0,11092	-0,055911
Mn	0,941127	-0,147717	0,0339022	0,0778519	0,126423
Co	0,927244	-0,0455325	-0,0304292	-0,085873	0,114053
Ni	0,893877	0,249358	0,243587	-0,105028	-0,0183989
Cu	0,860961	0,0996069	0,276987	0,283764	-0,0603455
Zn	0,545649	-0,143365	0,190343	0,424312	0,397665
As	0,537634	0,67744	0,00561303	0,362384	0,200869
Y	0,8458	-0,0792018	0,334115	0,278217	-0,125529
Mo	0,112872	0,569469	-0,0919666	-0,113763	0,609044
Cd	-0,0549491	0,392079	0,325365	-0,110746	-0,348264
In	0,105744	-0,174798	0,778579	-0,0675054	0,151617
Sn	-0,0328206	0,0251618	0,182481	0,00609996	0,697147
Sb	-0,0331221	0,694821	-0,0696164	0,551865	0,304002
Ba	0,547192	0,682922	0,133423	0,34686	0,0598666
Tl	0,360112	0,222389	0,641589	0,0312485	-0,141386
Pb	0,204674	-0,0426148	-0,0154913	0,843289	-0,0550181
Bi	0,668764	-0,00911144	0,532986	0,103681	0,280166
Th	0,483031	-0,168309	0,646572	0,201561	0,345587
U	0,656216	-0,245653	0,121406	0,315618	-0,149915
% varianza explicada	36,336	23,72	7,509	7,158	5,395
% varianza explicada acumulativa	36,336	60,056	67,565	74,723	80,118

El gráfico de cargas de las variables a los factores 1 y 2 (60% de



varianza acumulada) se muestra en la Figura 33.

Figura 33.- Gráfico de cargas de las variables a los factores 1 y 2

3.2.4. Estudio de la influencia de las variables de ensayo mediante análisis de la varianza

El análisis de varianza multifactorial se usó para determinar los factores e interacciones que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las variables del sistema edáfico estudiadas. Las *clases de tratamiento* analizadas son cuatro: A, B, C y D. Las *clases de días* corresponden a los períodos de análisis: 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90 días. Las *clases de temperatura* son: 21 °C y 35 °C (Tabla 29).

El análisis previo de los datos (test de rango múltiple) nos arroja como resultado la Tabla 29 donde para cada binomio variable-fuente de dispersión, nos indica las clases que aparecen. Así, para mL té/tratamiento, $n = 14$ (número de datos = 14), aparecen 4 clases: el tratamiento A tiene 0 valor para mL de té, el tratamiento B tiene 69, el tratamiento C 175,9 y el tratamiento D 87. Las letras minúsculas que acompañan a esas clases significan que los valores están o no próximos entre sí desde el punto de vista estadístico, así por ejemplo, la primera clase se diferencia netamente de las otras tres pero la clase segunda y tercera no se diferencian entre sí, significativamente.

Tabla 29.- Test de rango múltiple

Variable/Fuente de variación	n	Media de las clases
mL Té/Tratamiento	14	A:0.0a, B:69.0b, C:87.0b, D:175.9c
mL Té/Días	8	4:54.9a, 8:58.4ab, 15:65.6ab, 30:79.0bc, 45:99.8cd, 60:102.8cd, 90:120.4d
mL Té/Temperatura	28	21°C:69.1a, 35°C:96.8b
pH _{agua} /Tratamiento	14	C:7.95a, B:7.99ab, D:8.03b, A:8.04b
pH _{agua} /Días	8	30:7.9a, 45:8.0a, 60:8.0a, 4:8.0a, 90:8.0ab, 8:8.0ab, 15:8.1b
pH _{ClK} /Días	8	4:7.4a, 45:7.4a, 60:7.5a, 90:7.5a, 30:7.5a, 8:7.6b, 15:7.6b
Carbonatos/Tratamiento	14	C:39.2a, B:40.0a, D:41.0b, A:41.1b
CE/Tratamiento	14	A:639.9a, D:694.6a, B:732.3a, C:911.4b
CE/Días	8	4:579.6a, 30:608.6a, 15:642.6a, 45:687.1a, 8:740.3a, 60:745.6a, 90:1207.9b
CE/Temperatura	28	21°C:665.5 ^a , 35°C:823.5b
C.O./Tratamiento	14	B:0.80a, A:0.86ab, C:0.87b, D:1.04c
N/Tratamiento	14	D:0.060a, C:0.065ab, A:0.081bc, B:0.094c
N/Días	8	90:0.059a, 15:0.062a, 8:0.066ab, 30:0.067ab, 4:0.079ab, 60:0.085bc, 45:0.107c
P/Tratamiento	14	A:16.5a, D:24.1b, C:27.5b, B:28.5b
K/Tratamiento	14	D:350.4a, C:364.8b, A:379.6c, B:435.4d
K/Días	8	90: 355.6a, 60:378.6b, 15:381.6b, 4:382.8b, 45:387.7bc, 30:390.2bc, 8:401.4c
UFC/Tratamiento	14	A:429286.0a, B:617857.0ab, C:705714.0ab, D:930000.0b
UFC/Días	8	60,30,90,8,15 y 45, entre 320000a y 755000a, 4:1417560b
F. básica/Días	8	4:177.9a, 30:180.6a, 8:180.1a, 15:192.9b, 45:196.1b, 90:218.8c, 60:218.8c
F. básica/Temperatura	28	35°C:192.7a, 21°C:197.6b
F. ácida/Tratamiento	14	A:38.6a, C:39.1a, B:39.2a, D:45.5b
F. ácida/Días	8	8:28.7a, 60:30.8a, 15:38.5b, 30:41.1b, 4:41.5b, 90:47.2c, 45:56.6d
F. ácida/Temperatura	28	35°C:38.0a, 21°C:43.2b
Arisulfatasa/Tratamiento	14	A:14.0a, C:14.6ab, B:15.3bc, D:16.1c
Arisulfatasa/Días	8	90:10.7 ^a , 8:12.1b, 4:14.1c, 30:14.7cd, 45:15.7d, 15:18.5e, 60:19.1e
Arisulfatasa/Temperatura	28	35°C:12.0a, 21°C:18.0b
V/Tratamiento	14	A:70.6a, B:80.5b, C:89.7c, D:92.7c
V/Días	8	4:71.9a, 8:77.2ab, 45:82.9bc, 30:83.2bc, 15:84.8bc, 60:86.7c, 90:96.8d
Sc/Tratamiento	14	A:4.3a, B:5.2b, C:5.8c, D:6.2c
Sc/Días	8	4:4.5a, 8:4.8ab, 45:5.4bc, 30:5.4bc, 15:5.6cd, 60:5.7cd, 90:6.3d
Mn/Tratamiento	14	D:4174.1a, B:4235.9a, C:4520.2ab, A:4889.0b
Mn/Días	8	90:3469a, 60:3916ab, 8:4312bc, 30:4477c, 45:4536c, 15:4793c, 4:5679d
Mn/Temperatura	28	35°C:4251.0a, 21°C:4658.6b

En el análisis de la varianza (Tabla 30), las dos fuentes de variación más importantes en los datos resultaron ser tratamiento y días. El tra-

tamiento tuvo un efecto significativo sobre todas las variables excepto pHClK y fosfatasa básica. Aunque la mayor significación la obtiene en los mL de té añadidos, se trata de una relación obvia ya que a priori los distintos tratamientos suponen cantidades diferentes de té. El efecto significativo del tratamiento, es entonces, especialmente destacado en el K (F-ratio = 67) y en el contenido de C.O. (F-ratio= 20,5). Estas relaciones serán discutidas de manera más detallada en apartados posteriores.

Asimismo, los días influyeron significativamente en todas las variables excepto P, CO y carbonatos, con su principal efecto sobre las actividades enzimáticas en general y principalmente sobre la fosfatasa básica (F-ratio= 143,7).

La temperatura es la que presenta un menor número de influencias significativas sobre las variables ensyadas. Lo hace principalmente sobre las variables que miden la actividad enzimática, además de CE y Mn. Los valores medios de F. ácida, F. básica, Arisulfatasa y Mn fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores a 21 °C que a 35 °C. Al contrario, la CE crece con la Temperatura.

Si se establece la influencia conjunta de dos variables de ensayo sobre las variables del sistema edáfico (columna 4 de la Tabla 30) se destaca el elevado número de relaciones significativas. Las más importantes son: el N y el K con tratamiento-días y la de la arilsulfatasa con días-temperatura.

Tabla 30.- Significación estadística de las fuentes de variación en el sistema edáfico

Variable	Tratamiento	Días	Temperatura	Interacción
ml Té	141.32***	9.71***	20.60***	Trat-Días 6.85*** Trat-Temp 15.97***
pHagua	4.66*	5.40**	--	--
pHcloruro	--	10.75***	--	--
Carbonatos	8.96***	--	--	Trat-Días 3.24**
CE	6.17**	11.65***	11.15**	--
C.O.	20.54***	--	--	Trat-Días 3.41**
N	7.54**	4.93**	--	Trat-Días 4.79***
P	9.46***	--	--	--
K	67.00***	5.47**	--	Trat-Días 5.01***
UFC	3.43*	5.87**	--	--
F. básica	--	143.67***	19.71***	Trat-Días 4.63**
F. ácida	6.27**	30.84***	16.28***	Trat-Días 3.92**
Arisulfatasa	6.84**	48.88***	323.71***	Trat-Días 4.50** Días-Temp 11.35***
V	15.76***	5.26**	--	--
Sc	18.04***	5.05**	--	--
Mn	5.29**	13.96***	8.81**	Días-Temp 4.35**

* Poco significativo; ** bastante significativo, *** muy significativo

En general, los gráficos de dispersión y residuos (valor observado menos media del grupo) para las clases de los factores de variación exhibieron aproximadamente la misma variabilidad dentro de cada clase (Figura 34). Únicamente el factor días presenta alguna clase con más dispersión que el resto, indicando una ligera heterogeneidad de varianzas.

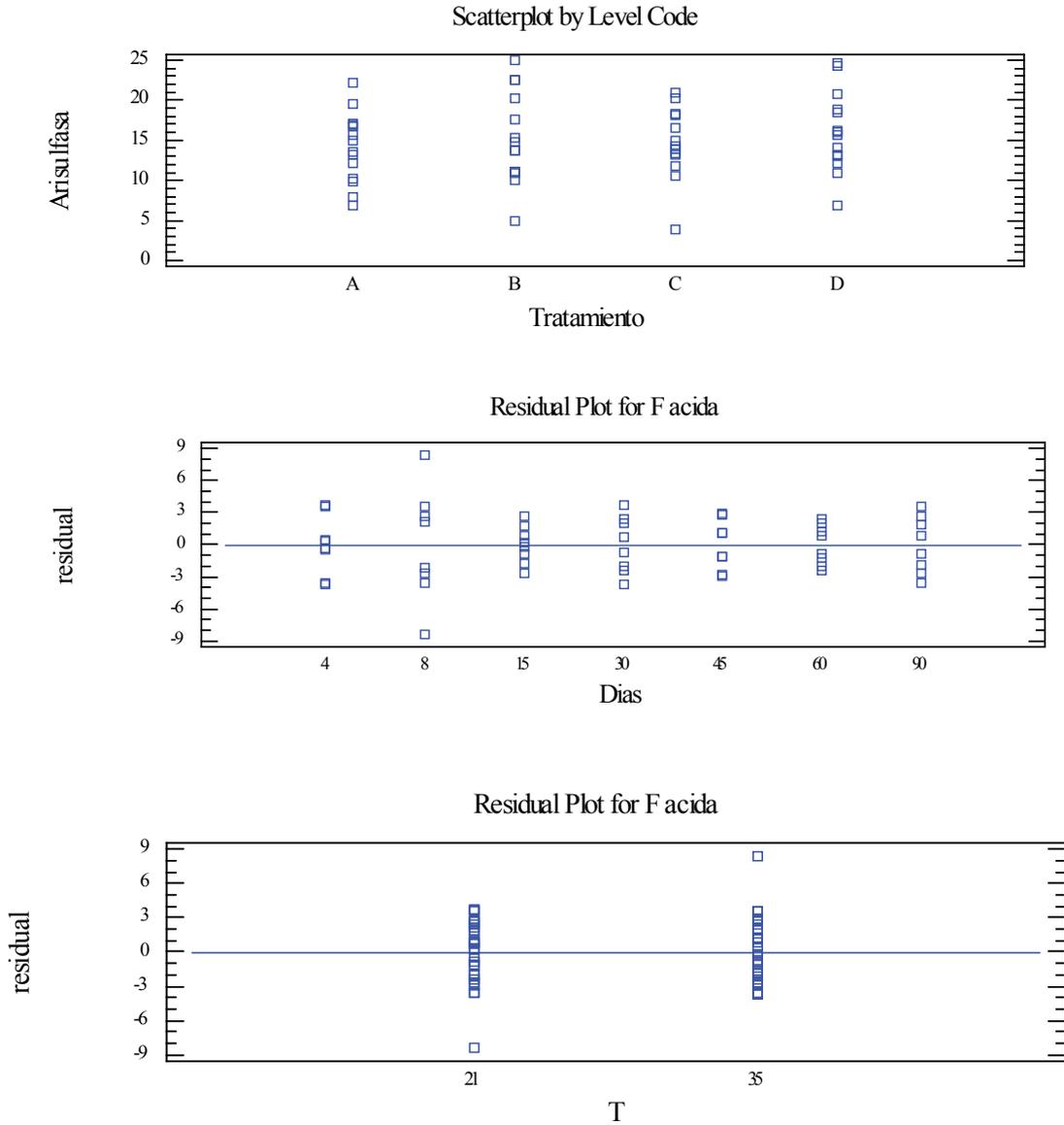


Figura 34a, b y c.- Gráficos de homogeneidad de varianza (algunos ejemplos)

La homogeneidad de varianzas, requisito que dota de consistencia al análisis de varianza, se ha verificado mediante gráficos de dispersión y gráficos de residuos. En la Figura 4 se recogen algunos de ellos para ciertas variables de respuesta que dan una idea del comportamiento de las variables y grupos estudiados en nuestro análisis estadístico. Así por ejemplo, en el gráfico de dispersión de la variable arisulfatasa, se observa que sus valores están similarmente diseminados en cada uno de los 4 niveles o grupos del factor tratamiento (A, B, C, D), lo que indica gráficamente una homogeneidad de varianzas o homocedasticidad. El análisis de los residuos, cuyos valores corresponden al valor observado menos la media del nivel o grupo al que pertenecen, permite una mejor apreciación del grado de homocedasticidad entre los niveles establecidos. Tanto la simetría en la distribución de los residuos de signo positivo y negativo en cada nivel, como la similitud en el rango de los residuos de uno y otro nivel de cada factor de variación, permiten estimar si las varianzas de una variable (por ejemplo, Carbonatos y Fosfatasa ácida) tienen similitud en los grupos o niveles de cada factor (por ejemplo, Tratamiento, Días y Temperatura). Para la variable Fosfatasa ácida, aunque la distribución de valores en los grupos establecidos para Días y Temperatura es relativamente uniforme (no hay grupos con los valores agrupados y otros con los valores dispersos), se observa una mayor dispersión en los residuos del «nivel 8 días» y alguna disimetría en los residuos de los dos grupos de temperatura. Tanto a 21 °C como a 35 °C hay una medida que aminora la homogeneidad de varianzas.

3.2.5. Evolución temporal de las variables del sistema edáfico

A continuación analizaremos, de manera pormenorizada, la evolución temporal de las variables del microcosmo edáfico, para lo que emplearemos una serie de gráficos en los que se representa dicha evolución en función del tipo de tratamiento (A, B, C, D) y de la temperatura de incubación (21 °C y 35 °C). Estos gráficos se han elaborado a partir de los datos que se recogen en las Tablas 31-34 incluidas en el anexo a este capítulo.

Parámetros químicos y físicoquímicos

pH:

Los valores de pH son muy similares en los 4 tratamientos ensayados y relativamente homogéneos a lo largo del tiempo que duran los experimentos, aunque se observa un incremento leve en los primeros 15 días (Figuras 35a-35d). No obstante desde el punto de vista estadístico, los valores medios son significativamente más altos en A y D que en B y C

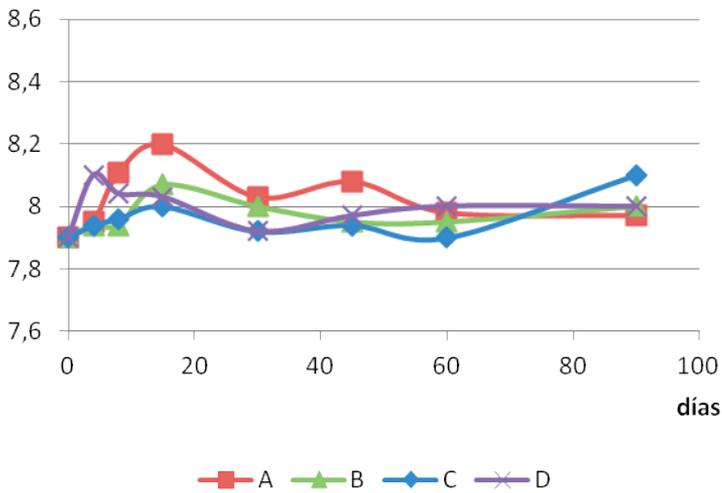


Figura 35a: Evolución del pH medido en agua en los microcosmos incubados a 21°C

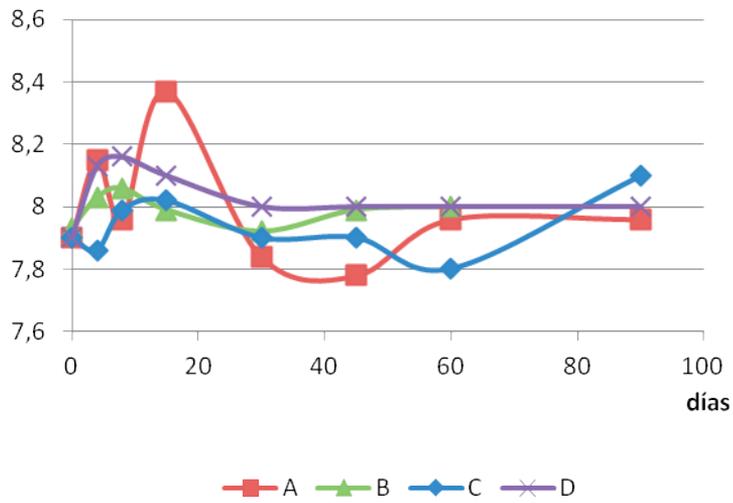


Figura 35b.- Evolución del pH medido en agua en los microcosmos incubados a 35°C

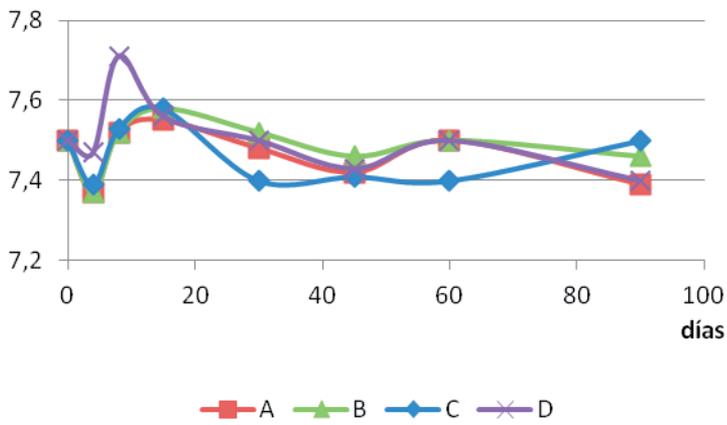


Figura 35c.- Evolución del pH medido en KCl en los microcosmos incubados a 21°C

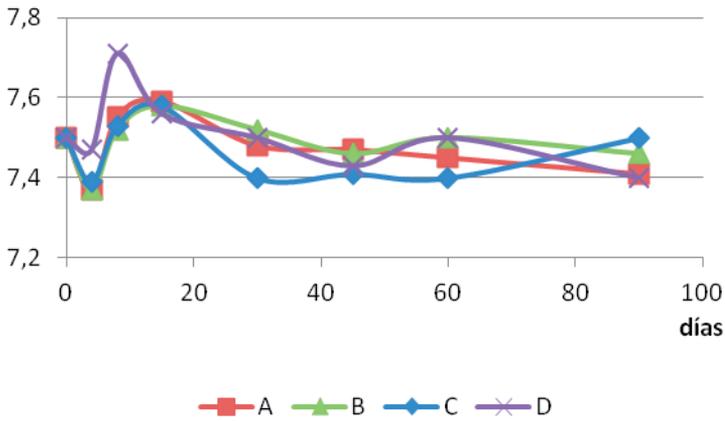


Figura 35d.- Evolución del pH medido en KCl en los microcosmos incubados a 35°C

Como es de esperar, los valores de pH medidos en agua son ligeramente superiores a los obtenidos cuando se mide con KCl (Schroeder, 1984) lo que se ha interpretado clásicamente en edafología por la presencia de sales que extraen los protones del complejo de cambio (arcilla y materia orgánica) lo que disminuye el pH en un rango de 0,5 – 1 en función del suelo. Dado que se añade aproximadamente la misma cantidad de agua, de té o de agua más té, la adición de té podría favorecer una ligera acidificación probablemente por degradación de la M.O. con formación de CO_2 (Porta, 2008). Aunque D recibe más mililitros de té que B, la intermitencia del tratamiento podría dificultar esa degradación de la materia orgánica antes indicada, por lo que en este caso no se aprecia una relación directa entre las cantidad de té añadido y el pH.

Conductividad eléctrica (CE)

En el caso de la CE, el test de múltiple rango señala claramente los mayores valores medios en el tratamiento C, 90 días y 35°C (Tabla 13), coincidiendo con los mayores contenidos de té. Este resultado se explica porque el té tiene una conductividad eléctrica superior (649 mS cm^{-1}) a la de la solución del suelo (450 mS cm^{-1}).

En términos generales los valores conductividad eléctrica muestran una tendencia al aumento, comportamiento dentro la normalidad si se riega con té de compost. No obstante, aunque el riego se efectúe únicamente con agua destilada, se produce igualmente un aumento leve (Figuras 36a y 36b) que podría explicarse si tenemos en cuenta el fenómeno de la hidrólisis de los minerales, que aumenta la concentración iónica en la solución del suelo (Birkeland, 1999).

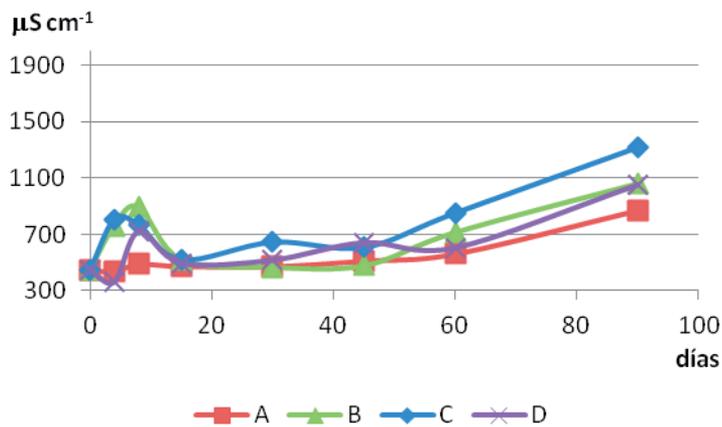


Figura 36a.- Evolución de la conductividad eléctrica en los microcosmos incubados a 21°C

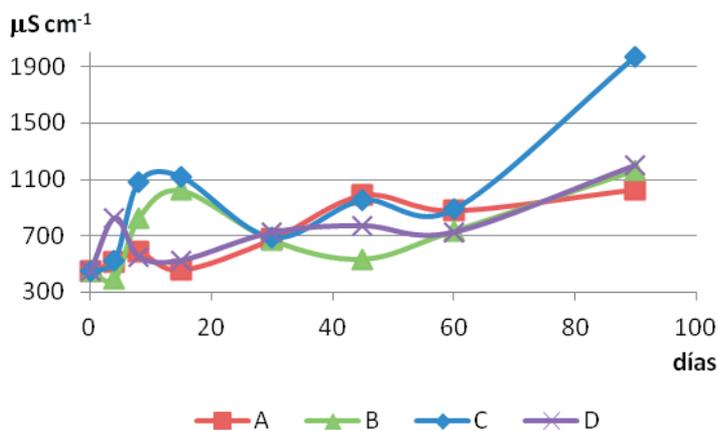


Figura 36b.- Evolución de la conductividad eléctrica en los microcosmos incubados a 35°C

Para interpretar el comportamiento de la conductividad eléctrica en el experimento, es importante no olvidar el hecho de que el ensayo se ha llevado a cabo sobre un “sistema cerrado” ya que en los microcosmos se han evitado los lixiviados, cosa que no ocurre en un sistema natural en el que el drenaje controla el contenido de sales. El té de compost es un producto que contiene sales por lo que su adición tiene también una relación directa sobre la conductividad eléctrica.

Carbonato cálcico equivalente (CaCO_3)

La evolución de los carbonatos muestra un comportamiento muy parecido al del pH. Así, los valores más bajos se observan en los tratamientos A y C, coincidiendo con los valores más bajos de pH y por tanto, con las condiciones más favorables para la decarbonatación (Figuras 37a y 37b).

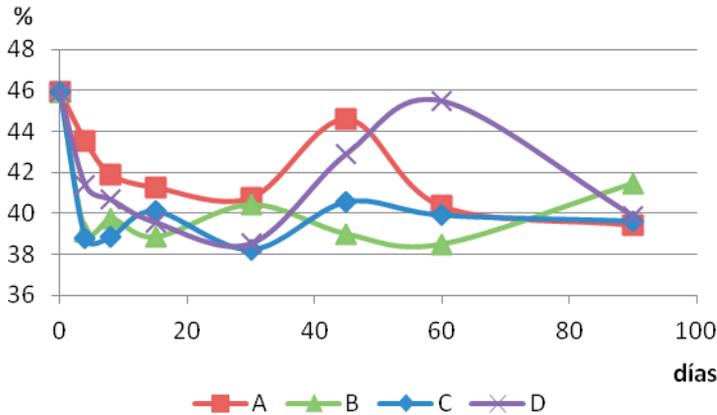


Figura 37a.- Evolución de los CaCO_3 equivalente en los microcosmos incubados a 21°C

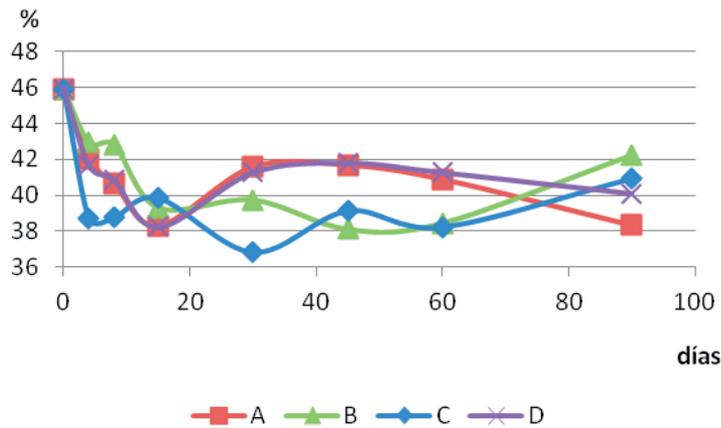


Figura 37b.- Evolución de los CaCO₃ equivalente en los microcosmos incubados a 35°C

A grandes rasgo, se aprecia un levísimo descenso del CaCO₃ equivalente en la primera fase de la experimentación (20 días aprox.) que puede deberse a la actividad biológica de los microorganismos del suelo que genera CO₂ y con ello la disolución de los carbonatos (Chesworth, 2008). En un sistema edáfico abierto el calcio liberado se puede depositarse en un lugar distinto, pero al ser los microcosmos un sistema cerrado sin pérdidas, ocurre una reprecipitación en el mismo lugar, lo que podría justificar los aumentos de carbonatos que ocurren posteriormente. Se aprecia una tendencia clara de disminución de carbonatos en el tratamiento C, lo que podría explicarse porque este proceso descrito de decarbonatación ligado a la degradación de materia orgánica se daría con mayor intensidad debido a los pequeños incrementos de carbono orgánico que supone la adición de té de compost.

Carbono orgánico (C.O.)

La cantidad de carbono orgánico que incorpora el té de compost a los microcosmos durante el riego es realmente pequeña (0,0095%) y las variaciones que se observan no son por tanto significativas (Figuras 38a y 38b).

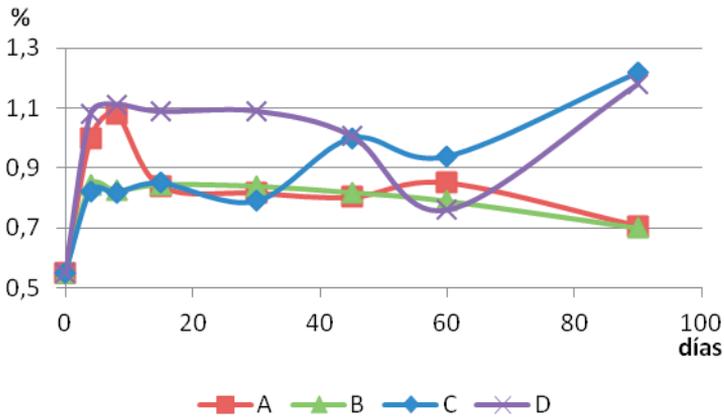


Figura 38a.- Evolución del contenido en carbono orgánico en los microcosmos incubados a 21°C

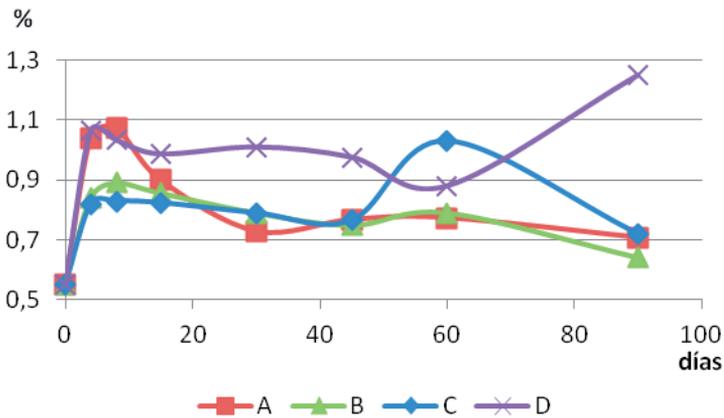


Figura 38b.- Evolución del contenido en carbono orgánico en los microcosmos incubados a 35°C

Los comportamientos de los microcosmos edáficos con respecto al carbono orgánico son fácilmente justificables cuando sólo se añade agua: la materia orgánica va menguando a lo largo del tiempo en las dos temperaturas ensayadas. Esta degradación de la materia orgánica por los microorganismos del suelo está muy descrita en la bibliografía y se

podría citar a Navarro (2003). La respuesta del suelo al tratamiento B es bastante similar a la del tratamiento A ya que se parte de una cantidad fija de materia orgánica: la suma de la que contiene el suelo natural más la que adiciona el único riego inicial con té de compost. La evolución del contenido de C.O. en los tratamientos C y D (Figuras 38a - 38b) es más difícil de explicar. En el caso del tratamiento C, se aprecia un aumento inicial con una disminución posterior pero a partir de los 45 días el incremento de C.O. y su posterior disminución no se corresponde con los datos microbiológicos. Por su parte, el tratamiento D se explica de la misma manera que en A y en B hasta los 60 días pero el aumento en los últimos períodos no es fácilmente explicable.

Macronutrientes: N P K

Comentaremos de manera conjunta el comportamiento de los macronutrientes principales dado que su evolución en los ensayos es algo similar entre sí, cuando se discute desde el punto de vista del tipo de tratamiento.

En los tratamientos que reciben más té de compost, se aprecia una tendencia al aumento en los valores medios de P, una disminución en el caso del K y un contenido sostenido de N.

En general, con la excepción del fósforo en el experimento a 35 °C podemos afirmar que, el tratamiento B es el más favorable para el incremento en el suelo de los tres nutrientes (Figuras 39 – 41).

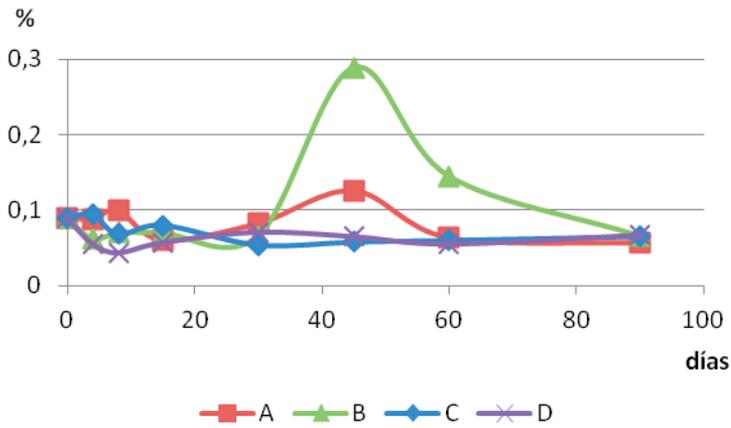


Figura 39a.- Evolución del contenido en nitrógeno en los microcosmos incubados a 21°C

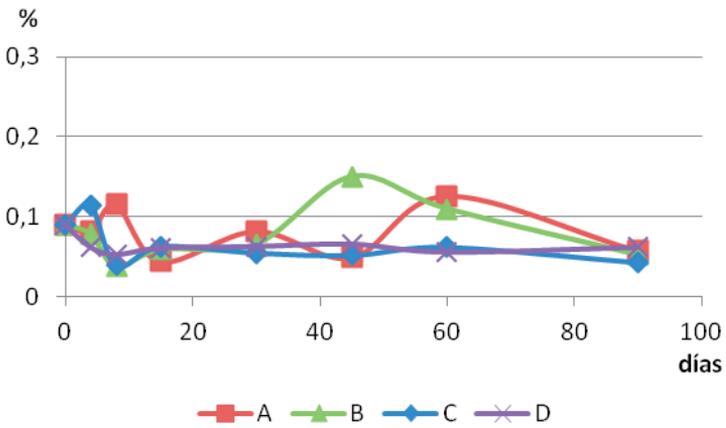


Figura 39b.- Evolución del contenido en nitrógeno en los microcosmos incubados a 35°C

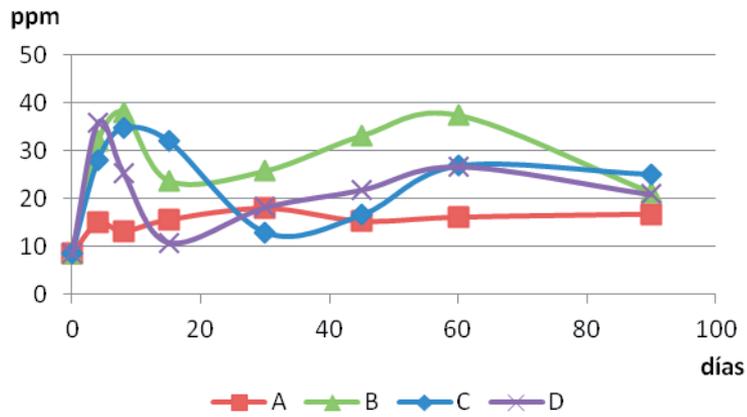


Figura 40a.- Evolución del contenido en fósforo en los microcosmos incubados a 21 °C

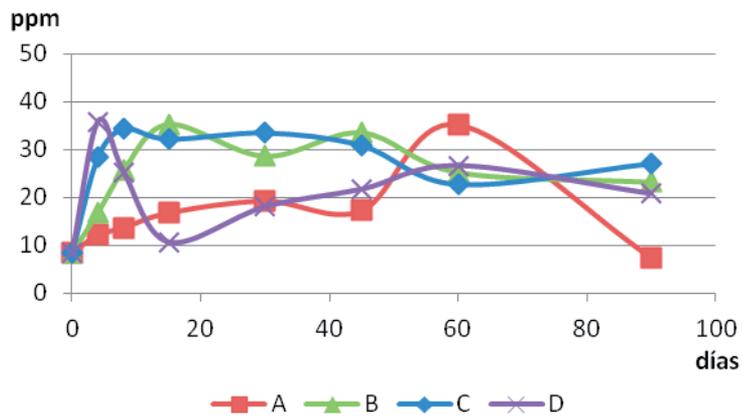


Figura 40b.- Evolución del contenido en fósforo en los microcosmos incubados a 35 °C

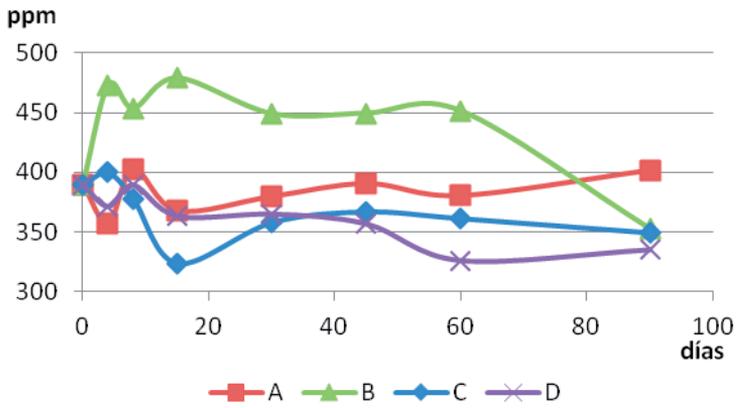


Figura 41a.- Evolución del contenido en potasio en los microcosmos incubados a 21 °C

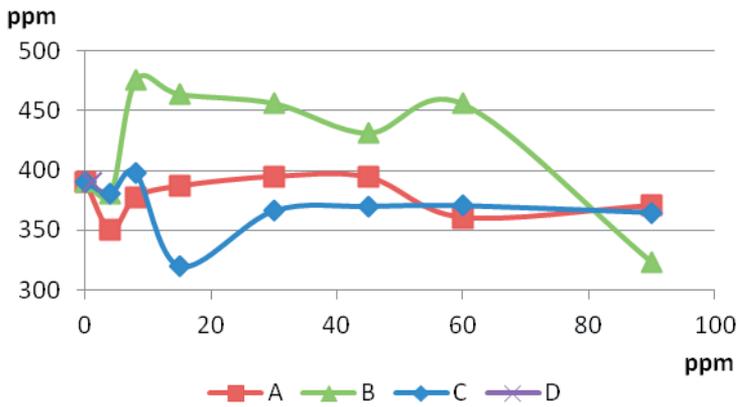


Figura 41b.- Evolución del contenido en potasio en los microcosmos incubados a 35 °C

Si los analizamos de manera individual se observa que sobre el N y el K, además del efecto significativo del tratamiento, dado que define el aporte y consumo, existe una interacción tratamiento-días (Tabla 12), de forma que las cantidades de nitrógeno y potasio no siguen una tendencia constante hacia el aumento o disminución con el tiempo, sino una distribución irregular. En el caso de fósforo, si se observa la Figura 10a y 10b, se distingue un comportamiento similar a los descritos anteriormente aunque no tan significativo.

Los aumentos del P pueden ser atribuidos a la mineralización de la materia orgánica y a la disminución temporal de los carbonatos, que en los suelos son uno de los principales causantes de la retrogradación del P (Navarro, 2003). El mantenimiento de las cantidades de N podría ser atribuido también al comportamiento de la materia orgánica. El caso del K y su disminución en los tratamientos C y D tiene una explicación más compleja y como ya se ha dicho anteriormente a la degradación de la materia orgánica lo que supone pérdida de K asimilable o a la entrada de K en la interlámina de los filosilicatos 2:1 con reconstrucción parcial de la mica (Birkeland, 1999).

Parámetros microbiológicos

Recuento de microorganismo aerobios mesófilos (UFC g-1)

A pesar de que anteriormente se ha indicado que los cambios en el número de UFC g-1 no son significativos desde un punto de vista microbiológico, en las Figuras 42a y 42b se observa un aumento en la cantidad de microorganismos del suelo a los 4 días y un contenido más bajo en el resto de días.

Las diferencias significativas entre medias por tratamiento, únicamente ocurren entre los tratamientos A y D. La observación de las figuras permite indicar que una adición moderada de té (87 mL en tratamiento D), favorece más la proliferación de bacterias que las adiciones bajas (69 mL en tratamiento B) o altas (176 mL en tratamiento C).

La temperatura no tiene efecto apreciable sobre la UFC aunque, como se expondrá a continuación sí sobre la actividad enzimática lo cual puede parecer una contradicción pero se explica más adelante.

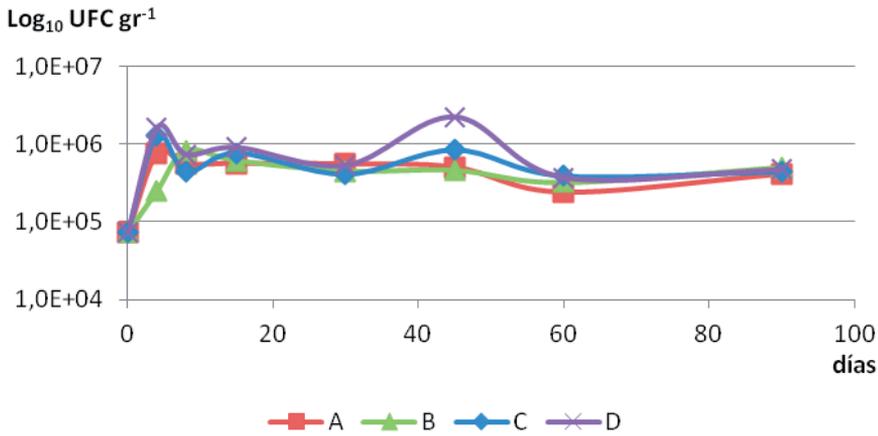


Figura 42a.- Evolución en la cantidad de microorganismos en los microcosmos incubados a 21 °C

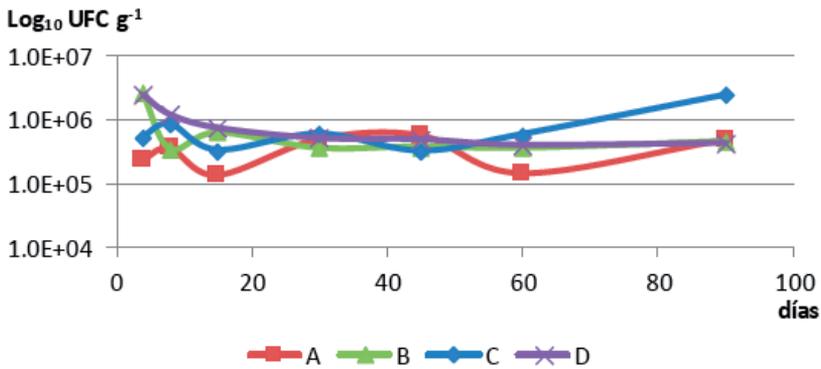


Figura 42b.- Evolución en la cantidad de microorganismos en los microcosmos incubados a 35 °C

El riego con té de compost estimula el crecimiento microbiano en el suelo en los primeros días de tratamiento ya que en las muestras analizadas a los 4 días se observa un incremento en la microbiota en aquellos microcosmos regados con té de compost (Tratamientos B, C y D) frente a los obtenidos de los microcosmos control (Tratamiento A), regados solo con agua destilada. Sin embargo, la adición de té de compost al suelo no parece representar beneficio para el crecimiento de los microorganismos a largo plazo, pues los niveles de población al final del periodo de experimentación eran similares en todos los tratamientos realizados.

Actividad fosfatasa ácida (F. ácida)

La aplicación del té de compost supuso un incremento de las actividades con respecto al valor de la muestra inicial (Figura 43a y 43b) en todos los tratamientos. Si bien, se observa un apreciable ascenso a los 45 días de incubación que se anula a los 60 días.

Al igual que ocurren en el número de microorganismos las diferencias significativas medias por tratamientos se observan únicamente entre A y D lo que de la misma forma se puede interpretar como que la adición de cantidades moderadas té (tratamiento D) son más favorables que los tratamiento B y C.

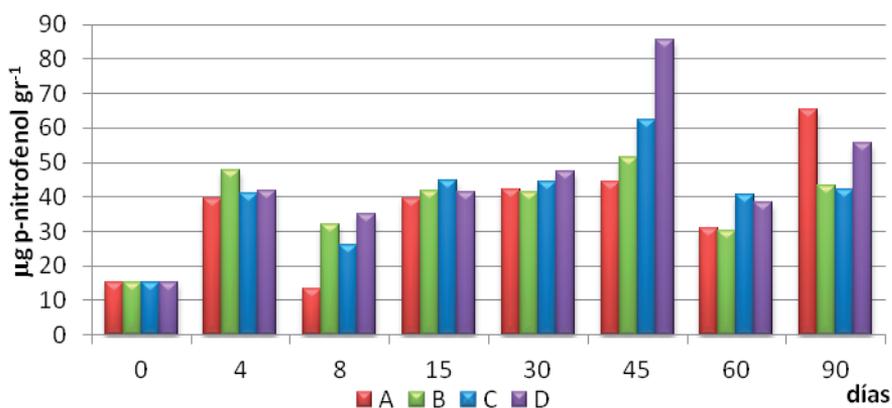


Figura 43a.- Evolución en la actividad fosfatasa ácida en los microcosmos incubados a 21 °C

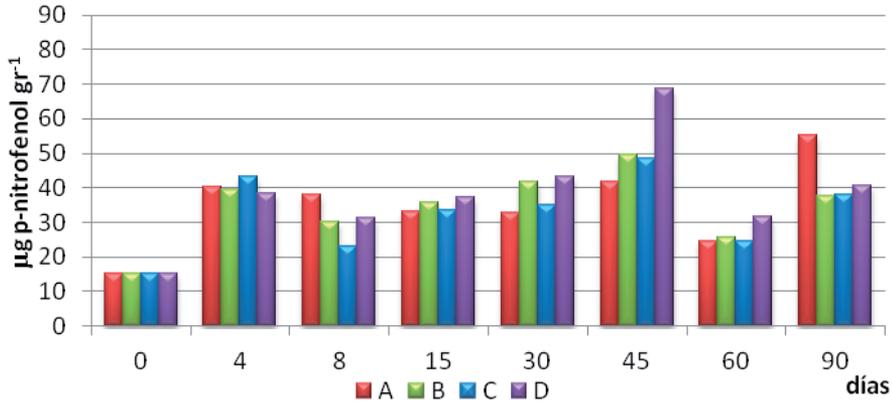


Figura 43b.- Evolución en la actividad fosfatasa ácida en los microcosmos incubados a 35 °C

Actividad fosfatasa básica (F. básica)

A pesar de lo indicado como tendencia general para las variables biológicas y bioquímicas, se aprecia un incremento significativo de la actividad fosfatasa básica hasta el final del experimento (Figura 44a y 44b), lo que indica un proceso de acumulación de esta enzima en los microcosmos.

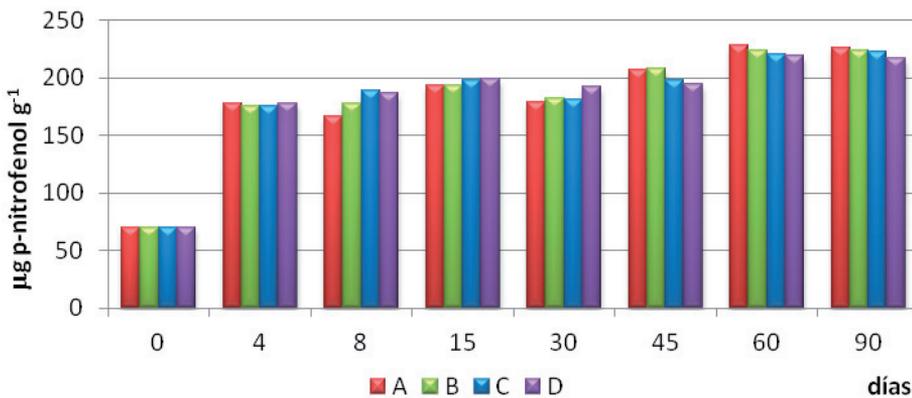


Figura 44a.- Evolución en la actividad fosfatasa básica en los microcosmos incubados a 21 °C

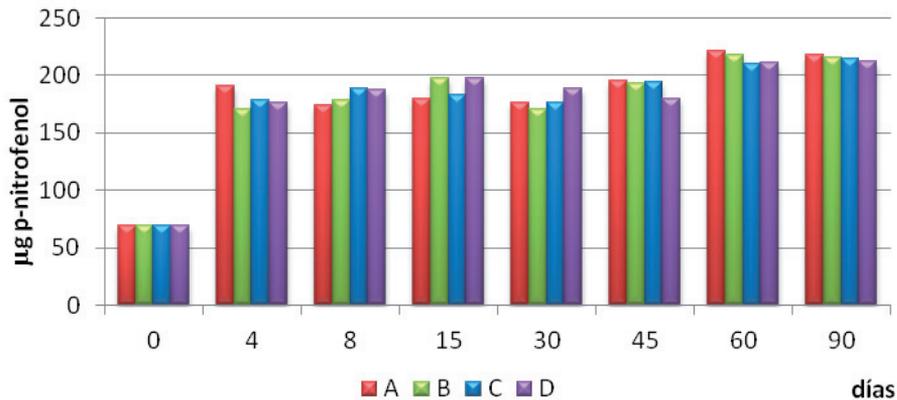


Figura 44b.- Evolución en la actividad fosfatasa básica en los microcosmos incubados a 35 °C

De manera general, los resultados no mostraron prácticamente diferencias entre los distintos periodos del experimento, sólo se aprecia el efecto acumulativo antes citado, pudiéndose indicar un efecto general positivo con respecto a los valores obtenidos en el tiempo cero. Resultados similares fueron obtenidos por Rivero et al., (2001); Tejada et al., (2006); Criquet et al., (2008), tras la aplicación de lodos de depuradora y por Perucci, (1990) tras emplear compost de residuos municipales. Sin embargo, y al igual que obtuvieron Crechchio et al. (2004) para lodos de depuradora, la aplicación de una dosis superior de té de compost (tratamiento C) no ha inducido un mayor incremento en la actividad fosfatasa alcalina. En nuestra experiencia, el riego exclusivo con té de compost no incrementó la actividad fosfatasa alcalina de la forma esperada. Uno de los posibles argumentos podría ser que el té de compost tiene un pH alcalino al igual que nuestro suelo, hecho que determina que la actividad fosfatasa alcalina no se vea incrementada de forma especial en los tratamientos B y C con respecto al tratamiento A.

Arilsulfatasa

De la observación de las Figuras 45a y 45b se concluye que el riego con té de compost (tratamientos B, C y D) ha favorecido la actividad de esta enzima en el suelo.

No obstante, al igual que ocurre con la actividad fosfatasa ácida y el contenido de microorganismos del suelo, la arilsulfatasa está más favorecida con adiciones moderadas de té (tratamiento D) que con las adiciones bajas o altas (Tratamientos B y C).

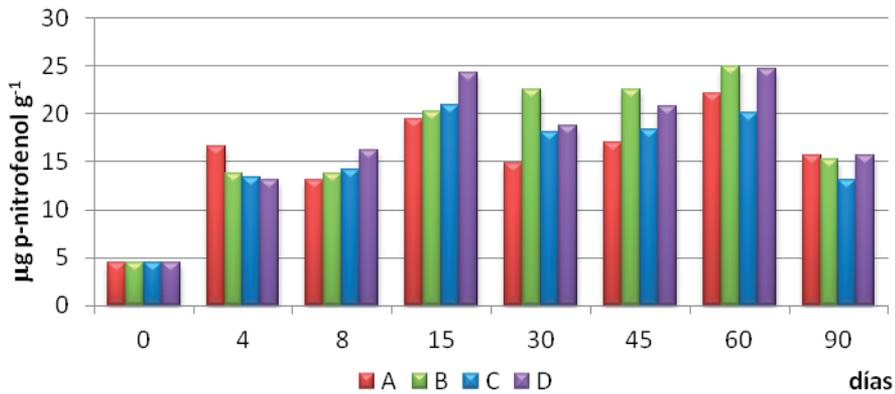


Figura 45a.- Evolución en la actividad arilsulfatasa en los microcosmos incubados a 21 °C

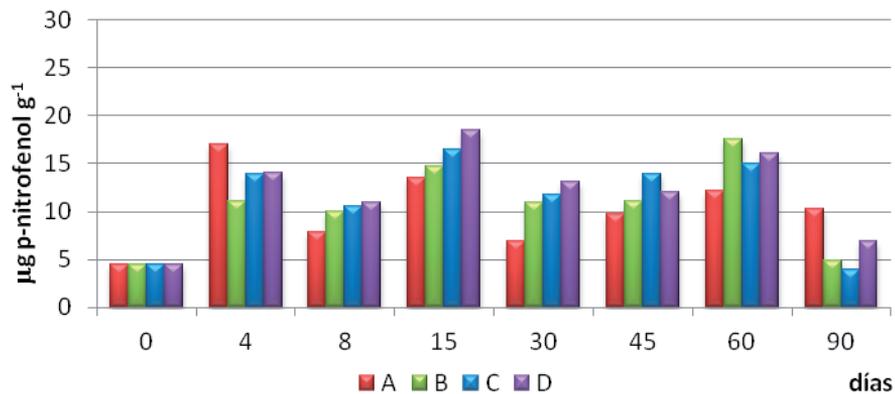


Figura 45b.- Evolución en la actividad arilsulfatasa en los microcosmos incubados a 35 °C

Aunque ya se ha discutido el efecto de la temperatura sobre las actividades enzimáticas en el apartado correspondiente a la UFC, en el caso de la arilsulfatasa dicho efecto es especialmente importante y por ello se incluye la Figura 46, donde se observa que la actividad arilsulfatasa es netamente superior en las muestras de suelo cuya temperatura era de 21 °C, independientemente del tratamiento aplicado y de los días transcurridos.

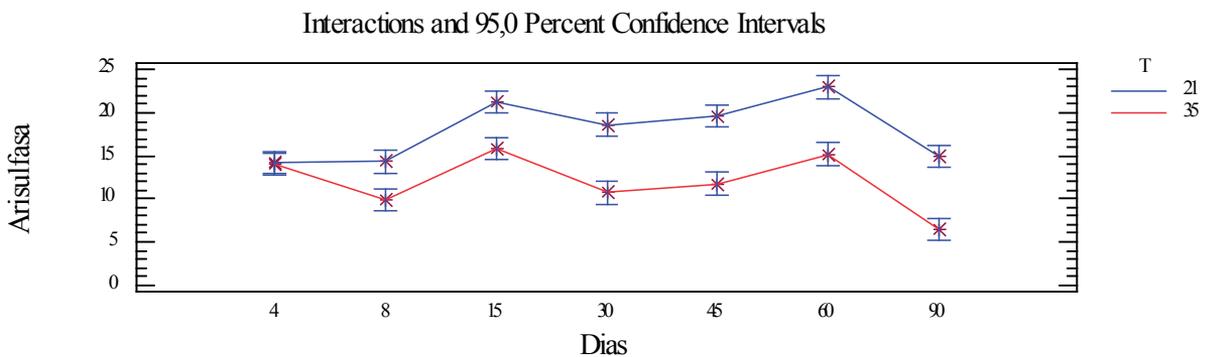


Figura 46.- Evolución comparativa de la actividad arilsulfatasa respecto al tiempo

En suma, sobre las variables biológicas y bioquímicas, el efecto principal corresponde a los días, siempre con mayor F-ratio que Tratamiento y Temperatura. No obstante, explicar el efecto temporal es complejo dado que los cambios que se producen no siguen netamente un orden ascendente o descendente de días, sino más bien una sucesión de subidas y bajadas.

Metales pesados

La presencia en el té de compost de metales pesados supone uno de los mayores problemas a la hora de poder aplicar este producto sobre el suelo. Aunque se han detectado y cuantificado hasta 22 metales pesados, se detalla a continuación (Figuras 47-52) la evolución de 6 de ellos: Mn y V que representan estadísticamente a un elevado número de metales

pesados, y Cu, Zn, Cd y Pb, con el fin de completar el estudio llevado a cabo con estos metales pesados en el apartado 2 de esta memoria.

Manganeso

Como ya se ha expuesto anteriormente en el apartado 3.2.3., el contenido en Mn se puede utilizar como una medida significativa de los contenidos en Co, Ni, Cu, As, Zn, Y, Bi y U. Por esta razón los gráficos del comportamiento del Mn (Figura 47a y 47b) también se pueden considerar como representativos del comportamiento del Co, Ni, Cu, As, Zn, Y, Bi y U.

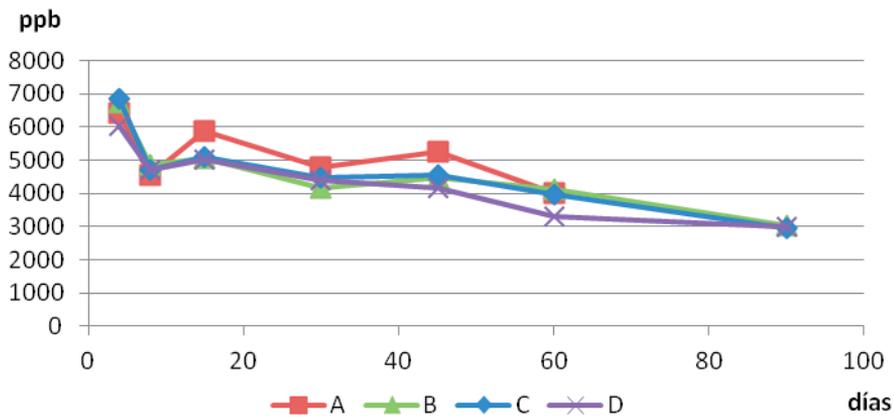


Figura 47a.- Evolución en el contenido de Mn en los microcosmos incubados a 21 °C

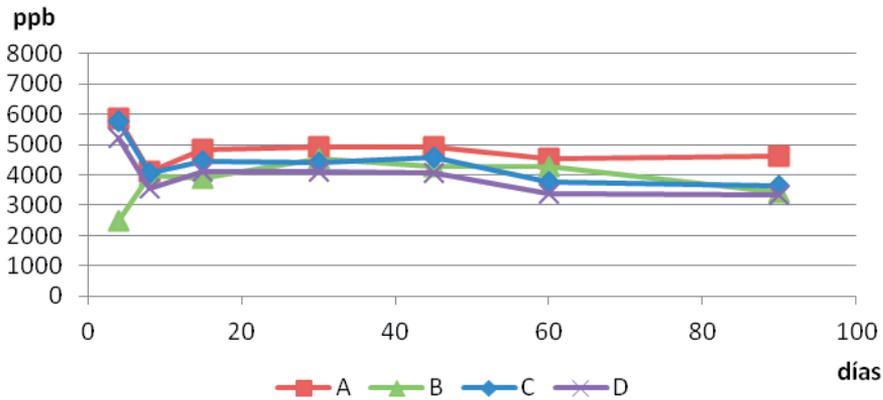


Figura 47b.- Evolución en el contenido de Mn asimilable en los microcosmos incubados a 35 °C

Aunque con algunas oscilaciones, la tendencia general que muestran los datos es descendente, es decir, la cantidad de Mn asimilable al principio de la experiencia es mayor que la cantidad de Mn asimilable al final. Esto ocurre en todos los tratamientos ensayados, no obstante la caída en los microcosmos incubados a 21 °C es mucho más acusada que la de los microcosmos incubados a 35 °C. A nivel de hipótesis, porque no se ha demostrado experimentalmente en este trabajo, podemos señalar que el Mn y su cohorte de metales asociados, se bloquean por la actividad de las bacterias del suelo y del té de compost. Este es un tema que necesitaría una mayor investigación ya que asociados al Mn hay metales de interés (Co, Ni, Cu...)

Vanadio

Se ha comprobado, igual que ocurre con el Mn, que el V está muy relacionado y representan al Sb, al Ba y al As y en menor medida al Mo y al Cd. Por este motivo, se entiende que Sb, Ba y As van a seguir una tendencia muy parecida mientras que el Mo y Cd algo similar (Figura 48a y 48b).

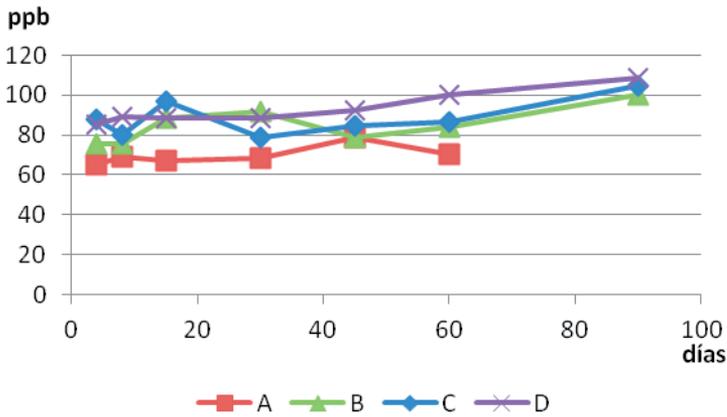


Figura 48a.- Evolución en el contenido de V asimilable en los microcosmos incubados a 21 °C

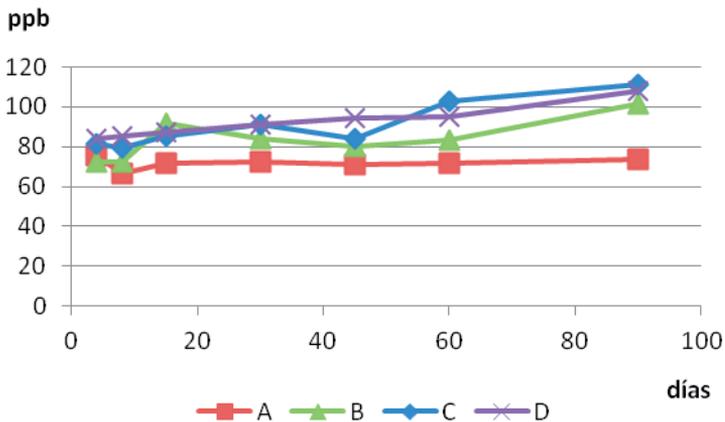


Figura 48b.- Evolución en el contenido de V asimilable en los microcosmos incubados a 35 °C

El contenido en V aumenta en los casos en los que los microcosmos han sido regados, con más o menos cantidad con té de compost, con el paso de los días. Es destacable que la cantidad de V asimilable en los microcosmos del tratamiento A se mantiene prácticamente constante y en los microcosmos correspondientes al tratamiento B, C y D muestra un aumento.

Con objeto de ampliar el conocimiento sobre los metales estudiados en el apartado 2 del presente trabajo, se recogen a continuación los gráficos (Figuras 49-53) que muestran como varían las cantidades de Cu, Pb, Zn y Cd en los microcosmos. Una visión general revela una tendencia general al descenso. Si bien en algunos casos hay pequeños aumentos u oscilaciones, la cantidad de Cu, Pb, Zn y Cd es menor al final de la experiencia que al principio. Si tenemos en cuenta las pequeñas cantidades de metales pesados asimilables que se añaden con el té de compost, los resultados inducen a confirmar la presencia de bacterias resistentes y con capacidad de eliminación de dichos metales.

Cobre

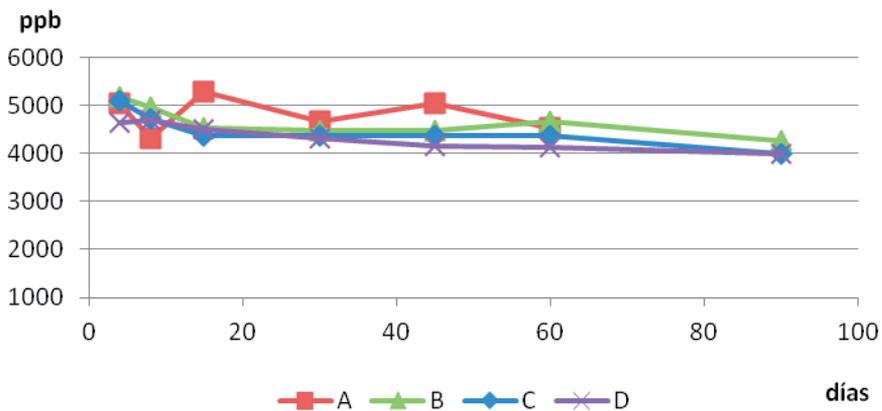


Figura 49a.- Evolución en el contenido de Cu en los microcosmos incubados a 21 °C

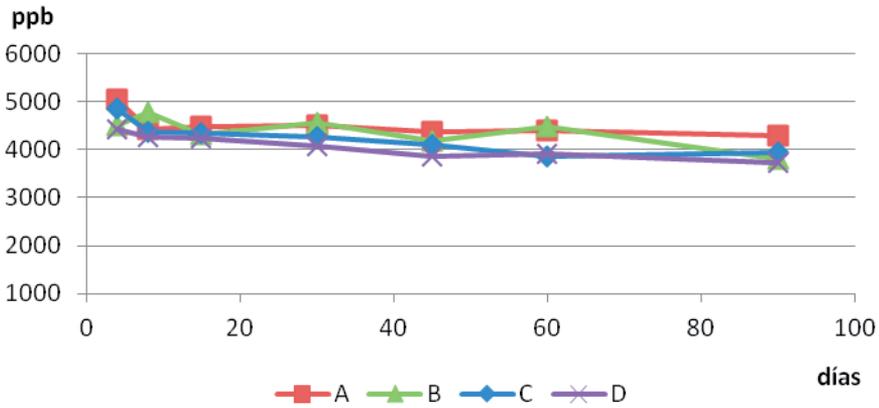


Figura 49b.- Evolución en el contenido de Cu en los microcosmos incubados a 35 °C
Plomo

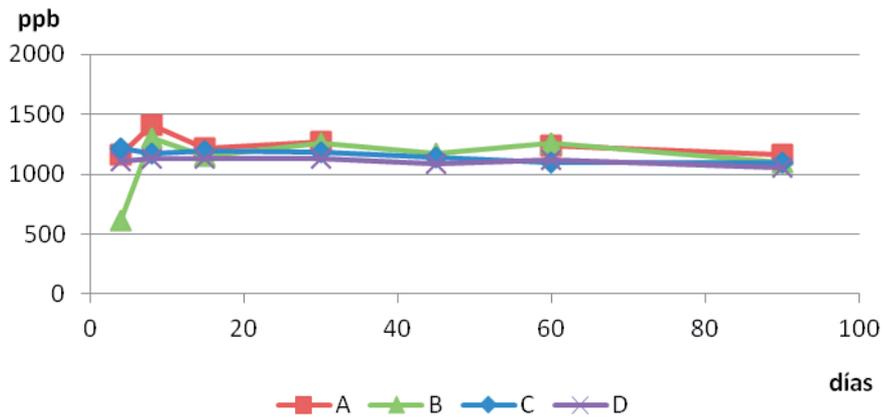


Figura 50a.- Evolución en el contenido de Pb en los microcosmos incubados a 21 °C

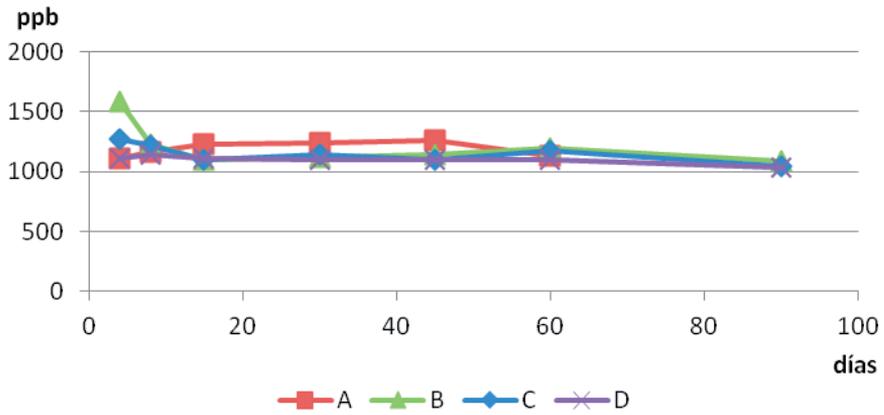


Figura 50b.- Evolución en el contenido de Pb en los microcosmos incubados a 35 °C
Zinc

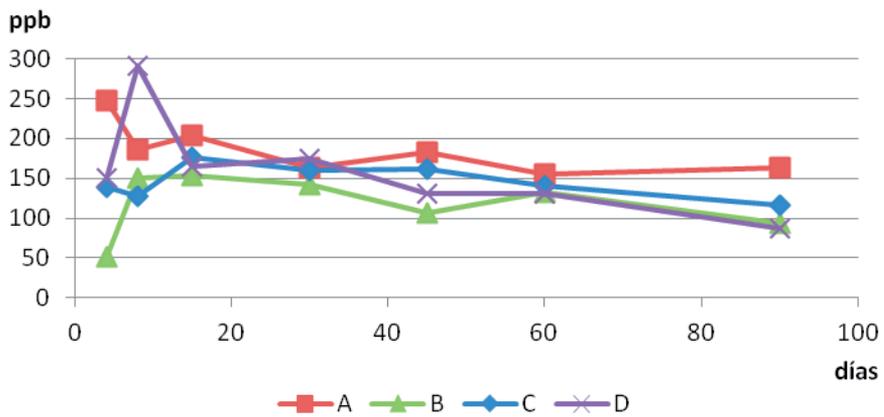


Figura 51a.- Evolución en el contenido de Zn en los microcosmos incubados a 21 °C

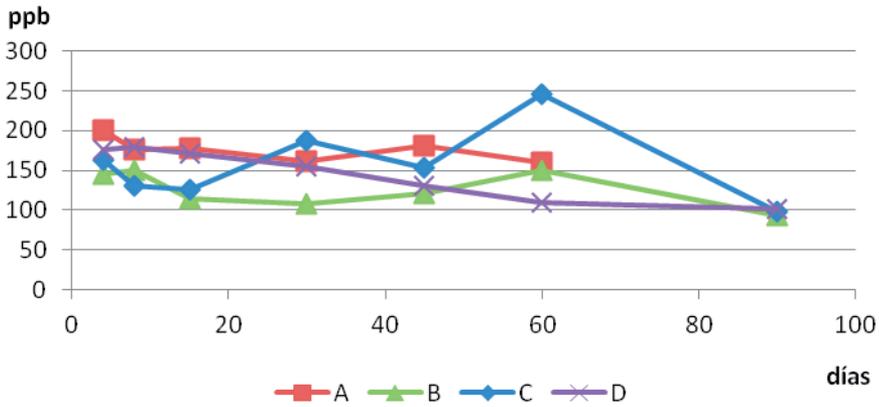


Figura 51b. - Evolución en el contenido de Zn en los microcosmos incubados a 35 °C
Cadmio

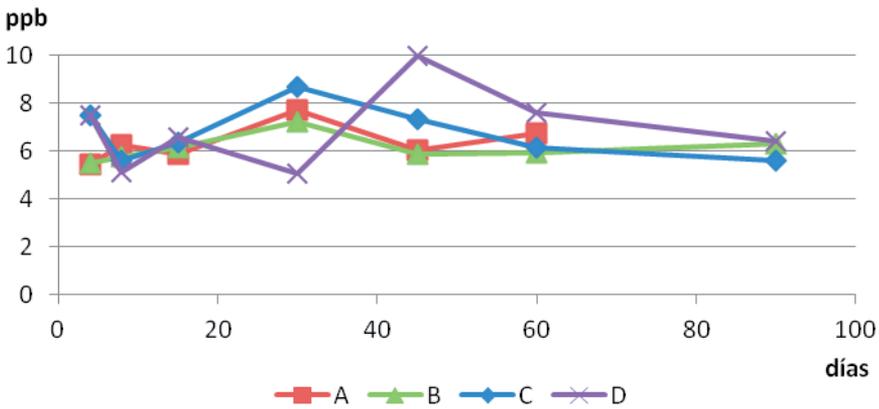


Figura 52a.- Evolución en el contenido de Cd en los microcosmos incubados a 21 °C

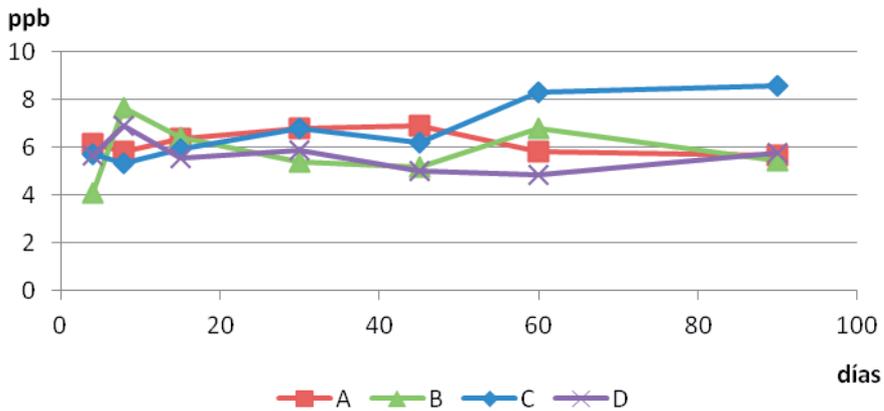


Figura 52b.- Evolución en el contenido de Cd en los microcosmos incubados a 35 °C

3.2.6. Estudio de las variables más representativas de los microcosmos edáficos, mediante análisis discriminante

Al objeto de encontrar las variables que más se afectaron por las condiciones experimentales establecidas, se usó análisis discriminante. Primero se determinaron las variables significativamente predictoras, mediante un algoritmo de selección basado en stepwise regresión, y después se ajustaron a ellas funciones discriminantes que maximizan las distancias entre los niveles o clases. La magnitud relativa de los coeficientes estandarizados en las respectivas ecuaciones sirve para determinar cómo las variables independientes están siendo usadas para discriminar entre clases.

Las siete variables discriminantes del proceso de cálculo se ajustaron significativamente a 3 funciones (Tabla 31). De ellas, las dos primeras explican el 92% de la varianza entre niveles.

Tabla 31.- Análisis discriminante de la clase “tratamiento”: Coeficientes estabilizados para 3 factores

	1	2	3
C.O.	0,179215	0,66428	-0,519247
P	-0,594513	0,159421	-0,0324879
K	-0,618876	-1,11958	-0,0601636
Sc	-0,980016	-0,250556	-0,572896
Mo	-0,498448	0,768553	0,721694
Sb	1,08686	0,128212	0,0261167
U	1,02528	0,152917	0,239942

La función 1 discrimina claramente el tratamiento A del resto, éstos últimos (B, C, D) con puntuaciones negativas (Figura 53) indicando que, en conjunto, en ellos hay un mayor contenido de P, K, Sc y Mo. Esto significa que la adición de té de compost tiene un efecto importante sobre el sistema edáfico ensayado, como ya se ha visto anteriormente y se sigue comprobando más adelante.

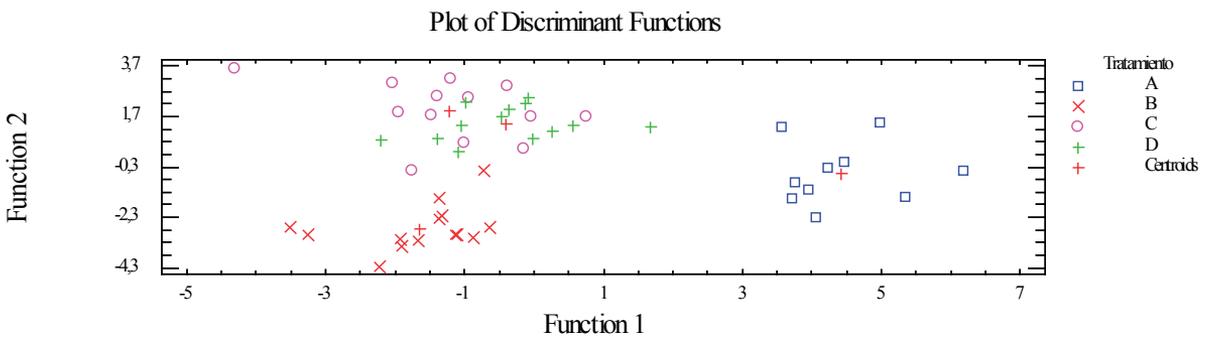


Figura 53.- Análisis discriminante de la clase “tratamiento”: Función 2 frente a Función 1

La función 2, prestando atención a la posición de los centroides (Figura 53), ordena de mayor a menor a los tratamientos C, D, A, B, cuyas puntuaciones se hacen más negativos especialmente por el aumento en K (variable independiente con coeficiente negativo de mayor magnitud). La disminución de K desde el tratamiento B a los tratamientos con mayor adición de té de compost (C y D), ha sido discutida anteriormente.

Las variables bioquímicas son las que mejor discriminan entre las clases de "días" (Tabla 32), confirmándose como las variables con mejor respuesta al tiempo de incubación.

Es especial, la función más discriminante (66,78% de varianza entre niveles) se debe principalmente a la variable fosfatasa básica. Los valores de esta función, que discrimina bien entre 4, 8/15/30, 45, 60 y 90 días (Figura 54), son tanto más negativos cuanto mayor contenido en fosfatasa. No hay diferencias manifiestas según esta función entre los clases 8, 15 y 30 días, pudiendo indicar que no hay cambios significativos en la actividad fosfatasa básica durante este periodo de tiempo.

La fosfatasa ácida y también los metales Co, Sb y Ba son discriminantes de los días, de acuerdo con la función 2, explicando 12,86% de varianza entre niveles.

Tabla 32.- Análisis discriminante de la clase "días": Coeficientes estandarizados para 6 factores

	1	2	3	4	5	6
pH _{ClK}	0,0820059	0,181288	0,472648	-0,14321	1,05881	-0,167102
F. ácida	-0,26621	0,941806	-0,359721	0,193724	0,573986	0,201323
F. básica	-1,12196	0,159625	0,270091	-0,529938	-0,0543586	0,132413
Arisulfatasa	0,661524	-0,144098	0,936591	1,07826	-0,0309857	0,150335
Co	0,617718	1,07318	0,918914	-0,678546	0,0544172	-0,237006
Sn	-0,421423	0,757276	0,850291	1,20902	0,279857	-1,07423
Ba	-0,0389976	-1,57811	-1,57926	-0,408369	-0,262041	1,02504

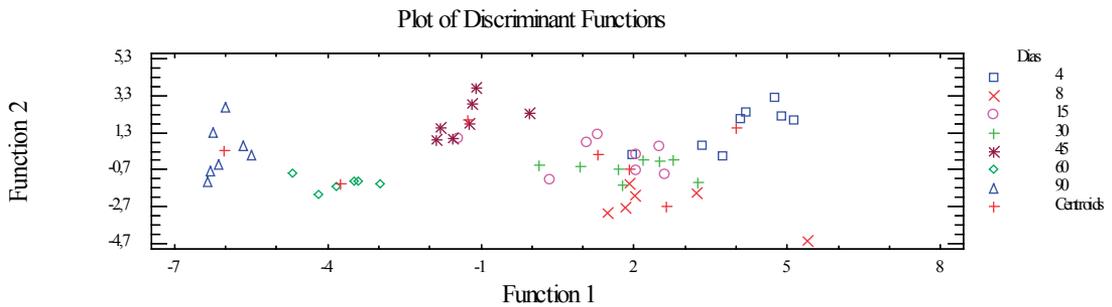


Figura 54.- Análisis discriminante de la clase “días”: Función 2 frente a Función 1

Por último, los dos grupos de temperatura se diferencian significativamente por mL de agua, mL de té, C.O., Tl y Bi agrupados en una única función (Tabla 11). De acuerdo a los valores de esta función (Figura 55), se adicionó más agua y té a 35 °C (puntuaciones negativas), mientras que hay menos degradación de C.O. y más disponibilidad de Tl a 21 °C. El sentido de estas relaciones es obvio en el caso del agua y del té y se explica fácilmente en el caso de la materia orgánica. Es bien conocido que a mayor temperatura ocurre una mayor degradación de la materia orgánica.

Tabla 33.- Análisis discriminante de la clase “temperatura”: Coeficientes estandarizados para 1 factor

	1
mL agua	-0,982115
mL té	-0,551491
C.O.	0,428655
Tl	1,25326
Bi	-0,816332

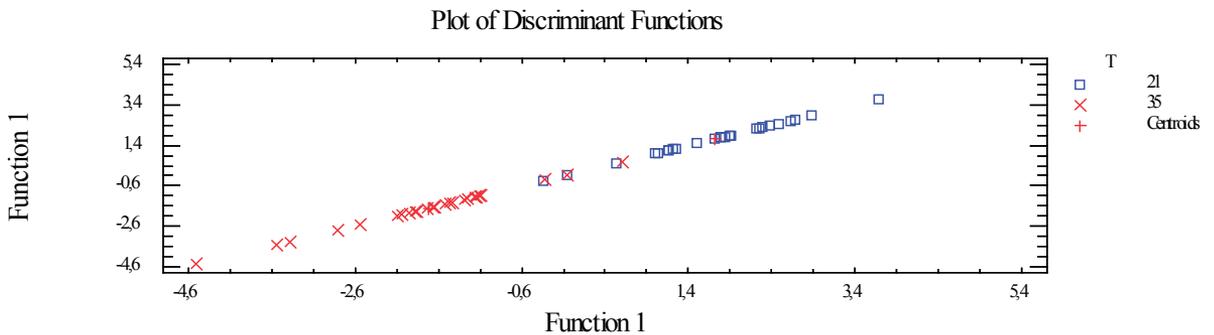


Figura 55.- Análisis discriminante de la clase “temperatura”: Función 1 frente a Función 1

3.2.6. Relaciones entre las variables de los microcosmos edáficos, según las distintas condiciones experimentales

La constatación de factores de variación en el total de los datos invita a analizar las relaciones entre variables bajo condiciones más homogéneas. Separando los datos por tratamiento y temperatura, se observa un aumento en el valor y número de los coeficientes de correlación (Tabla 34) respecto al análisis de la población total (Tabla 2). Hay variables con respuesta bajo unas condiciones pero no bajo otras y, asimismo, variables que tienen respuestas diferentes según las condiciones experimentales.

El aumento de la significación estadística para la relación entre variables cuando se analizan atendiendo al tipo de tratamiento, es un hecho interesante que puede interpretarse de dos maneras. En primer lugar señala la importante influencia que tiene el modelo de riego con té de compost sobre las respuestas de los microcosmos edáfico, teniendo incluso más peso la distribución del riego que la cantidad de té añadida tal y como comentamos anteriormente, y en segundo lugar valida el experimento planteado en el que se ha ensayado tres modalidades de riego.

Tabla 34.- Correlaciones en cada tratamiento (A, B, C, D) y temperatura (21°C, 35°C).
Sin suelo original/ Con suelo original (n=7/n=8)

Variables	A-21°	A-35°	B-21°	B-35°	C-21°	C-35°	D-21°	D-35°
Días-agua	0,99/0,95	0,97/0,95	0,99/0,99	0,99/0,99			0,99/0,99	0,97/0,97
Días-té					0,99/0,95	0,99/0,97	0,89/0,69	
Días-riegototal			0,99/0,95	0,99/0,97			0,99/0,95	0,99/0,96
Días-pHa								-0,74/
Días-pHCl								-0,70/
Días-CE	0,88/0,88	0,90/0,92			0,71/0,76	0,71/0,75	0,77/0,80	0,76/0,80
Días-CO	-0,80/	-0,81/	-0,88/	-0,92/	0,90/0,92			
Días-K			-1				1	
Días-UFC	-0,75/							
Días-F.ácida	/0,73							
Días-F.básica	0,88/0,72	0,83/	0,91/0,70	0,80/	0,86/0,65	0,87/0,82	0,87/	0,75/
Días-Sc			0,6			0,93/	0,97/	0,98/
Días-Mn			0,977011494		-0,85/	-0,68/	-0,92/	
Agua-Té							0,86	
Agua-riegotota			1/0,94	1,0/0,99			0,99/0,93	0,98/0,97
Agua-pKcl	/-0,74							
Agua-CE	0,86/0,78	0,95/0,94					0,78/0,80	0,71/0,77
Agua-CO	-0,84/	-0,84	-0,85	-0,92				
Agua-P	/0,76							
Agua-K			1				1	
Agua-UFC	-0,75/							
Agua-F.ácida	/0,78							
Agua-F.básica	0,90/0,89	0,82/0,81	0,93/	0,79/0,70			0,89/	0,87/
Agua-Sc			0,62				0,97/	0,97/
Agua-Mn			0,976744186				-0,88/	
Te-riegototal							0,92/0,86	/0,73
Te-pHa								-0,75/
Te-pHcl							/-0,94	/-0,89
Te-CE					0,75/	0,68/0,75		
Te-CO					0,89/0,90			
Te-N					/-0,76	-0,67/	/-0,75	/-0,75
Te-K							1	
Te-F.ácida							/0,75	0,75/0,84
Te-F.básica					0,86/0,83	0,85/0,77	0,77/0,97	/0,81
Te-arisulfatasa							/0,80	
Te-Sc						0,89/	0,85/	
Te-Mn					-0,83/	-0,68	-0,82/	
Riegotot-pHcl								/-0,79
Riegototal-CE							0,76/0,74	0,76
Riegototal-CO			-0,85/	-0,92/				
Riegototal-K			1				1	
Riegotot-UFC								-0,75
Riego-F.básica			0,93/0,88	0,79/0,79			0,88/0,82	0,81/0,78
Riegototal-Sc			0,62/				0,97/	0,98/
Riego-Mn			1				-0,89/	
pHa-pHcl	0,78/			0,84/	0,92/	0,71/		0,88/
pHa-CE				0,77		0,79		
pHa-CO						0,986486486		
pHa-P								0,77/0,74
pHa-UFC		-0,89/						
pHa-arisulfas						1,014705882		
pHa-Sc								-0,74
pHcl-CE								0,987179487
pHcl-CO3			/0,89		/0,75	/0,88		/-0,71
pHcl-N							/0,85	0,75/0,70
pHcl-P	/-0,89		/-0,89	0,85/		/-0,79		
pHcl-UFC							-0,8/	
pHcl-F.ácida	/-0,72	/-0,81	/-0,80	/-0,72	/-0,81	/-0,67	1	/-0,80

pHCl- F.básica	/-0,87	/-0,91	/-0,90	/-0,81	/-0,75	/-0,86	/-0,80
pHCl- arisulfa	/-0,74		/-0,78		/-0,84		/-0,79
pHCl-Sc				0,82/0,82			
pHCl-Mn				/0,83			
CE-CO3						0,80/	
CE-CO		-0,74/	-0,74/		0,77/0,81		0,75/0,80
CE-N						/-0,70	
CE-F.básica		0,75/				0,71/	
CE- arisulfasa						-0,76	
CE-Sc				0,80-0,81			0,76/
CE-Mn	-0,81					-0,68	
CO3-CO			/-0,78				1,047619048
CO3-N	0,86/0,88						
CO3-P			/-0,87	/-0,76		/-0,79	
CO3-K			1				
CO3- F.básica			/-0,73		/-0,72	/-0,67	/-0,72
CO3- Arisulfas			/-0,77	/-0,72		/-0,67	
CO-P	-0,78/						
CO-K			0,95/0,95	0,74/0,74			
CO-F.ácida	-0,84/						
CO-F.básica	-0,75/		-0,75/		0,80/0,68		0,74/
CO- asisulfas						/0,64	-0,78/
CO-Mn					-0,7		
N-P							/-0,74
N-UFC					0,78/	0,90/	
N-F.ácida							0,79/
N-F.básica					/-0,79	/-0,67	/-0,82
N-arisulfas					/-0,74		/-0,95
N-Mn					0,76	0,86	
P-F.ácida		-0,86/		/0,71			
P-F.básica	/0,91		/0,74	/0,79	/0,71	-0,875	
P- Arisulfatasa	/0,84						
P-Sc						-0,78/	
K-F.básica							1
K-Sc					-0,76/		-0,88/
K-Mn							0,76/
UFC-F.ácida		/0,72					0,68/0,76
UFC- F.básica	-0,79/						
UFC-Sc				1			
UFC-Mn			0,76/0,76	1,128205128	0,85/	0,88/	0,79/
F.ácida- Fbasic			/0,71				
F.ácida- arisulf					/0,74		
F.básica- arisul	/0,91		/0,81		/0,80		/0,84
F.básica-Sc						0,86/	0,93/
F.básica-Mn					-0,81/	-0,72/	-0,90/
Arisulfasa- Sc		0,81					-0,76/

Debido a que las relaciones entre cada par de variables ya han sido suficientemente descritas, se pensó, por tanto, que quizás sería más informativo establecer ecuaciones de regresión múltiple en cada uno de los tratamientos (A, B, C, D) para completar así el capítulo, que nos permiten establecer funciones de pedotransferencia. Como variables independientes se utilizaron aquellas que reflejan las condiciones experimentales. Siempre están días y tiempo y, según el tratamiento, también mL agua y/o mL té. Sólo se utilizaron mL totales en el tratamiento B (69 mL de té más los mL de agua).

Al igual que se hizo para el total de datos, se probaron modelos de regresión lineal para cada variable fisicoquímica y microbiológica y para el Sc y Mn. Se muestran sólo los resultados cuya significación es menor de 0,05.

Tratamiento A (control)

El sentido de las correlaciones en el tratamiento en blanco (A) a 21 °C indica que, de modo natural, la humectación del suelo y el paso del tiempo suponen una bajada de pH, C.O. y UFC, mientras que aumenta CE, P, F. ácida y F. básica. La actividad arisulfatasa también se favorece con la disminución de pH e incremento del contenido en P. El sentido de estas relaciones ya fue discutido para el total de las variables. Llama la atención la relación inversa (-0,79) entre la cantidad microorganismos aerobios mesófilos y la actividad enzimática fosfatasa básica. La aparente contradicción de esta correlación se explica de la misma que se hizo anteriormente aduciendo que la actividad biológica aumenta en las primeras etapas de incubación (Figura 56) y disminuye hacia el final del experimento mientras que la actividad enzimática va creciendo con los días del experimento hasta las últimas etapas, ya que se trata de una exoenzima que se acumula en el sistema edáfico.

A 35 °C, repite la ya discutida disminución de C.O. y aumento de C.E. y F.básica con el tiempo de humectación. Cuando la acidez aumenta (disminuye el pH) la UFC y fosfatasas debido a la actividad microbiana.

Al igual que ocurre cuando se estudia la totalidad de las variables Al margen de las interrelaciones entre metales pesados que son similares a las descritas para la totalidad de las variables se encuentran escasas relaciones con algunas variables del microcosmo edáfico que a su vez están relacionadas con el tiempo, lo que puede indicar que es el tiempo, como variables indirecta, la que condiciona esas escasas relaciones.

De la misma forma que ocurre en el análisis estadístico del total de variables, se observan importantes interrelaciones entre los distintos metales pesados (Tabla 12). De forma que se establecen 3 familias; la familia del Mn, la familia del Sc y la familia de los metales que no se relacionan con ninguno de ellos.

Por su parte, las ecuaciones de regresión múltiple para el tratamiento A (Tabla 35) nos muestran que la CE el C.O., la fosfatasa básica y la arilsulfatasa se pueden predecir a partir los días del experimento, la temperatura de incubación y los mL de agua empleados en el riego.

En el caso concreto de la CE la correlación es particularmente significativa (0,0001) y la Figura 35 nos muestra que dicha conductividad se puede predecir a partir de las variables de ensayo con una gran precisión. El resto de variables que se pueden predecir están tanto en relación directa como inversa con las variables de ensayo siendo destacable que tanto al C.O. como a la fosfatasa básica y arilsulfatasa le afecta negativamente el aumento en los mL de agua añadidos.

Tabla 35.- Ecuaciones de regresión para el Tratamiento A

Variable de Y	Coeficiente de las variables independientes				Estadísticos			
	ordenada en el origen	DÍAS	Tª	mL agua	R ²	R ² ajustada	SEE	P-value
CE	272,538	0,510254	0,695005	1,90851	88,1894	84,6462	82,6682	0,0001
C orgánico	0,93459	-0,00144296	0,00437392	-0,00081985	68,0567	58,4738	0,0856624	0,0077
F. Básica	174,166	0,738934	0,12479	-0,0532275	73,8594	66,0173	12,356	0,0029
Arilsulfatasa	22,3863	0,0827953	-0,201512	-0,0328764	53,9022	40,0728	3,38909	0,0442

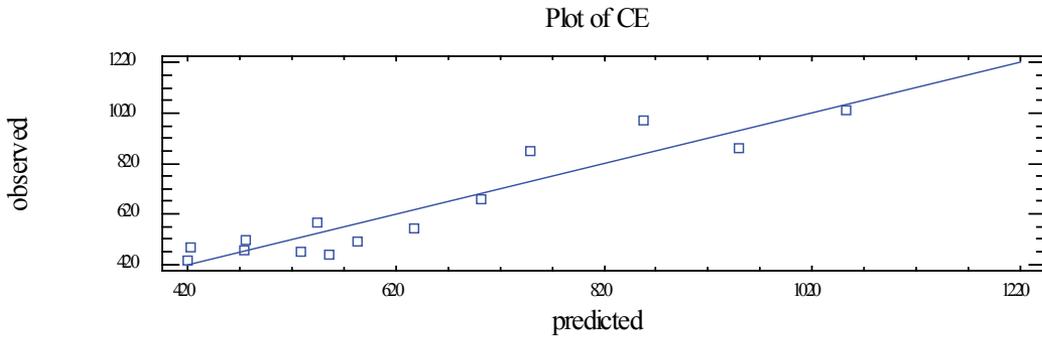


Figura 56.- Gráfico de correlación para la CE (mayor R2) $CE=278.538 + 0,510254Días + 0,695005Temperatura + 1,90851mL\ agua$

Tratamiento B

En el tratamiento B (con una dosis baja de té) hay más índices de correlación a 21 °C que a 35 °C. De nuevo se observa que con el tiempo y riego disminuye C.O. y aumenta F. básica, pero ahora a 21 °C hay también una disminución de K. La disponibilidad de este elemento no se ha medido en el suelo original, pero se aprecia un consumo en el tratamiento B en paralelo con C.O. Quizás se trata del K del complejo de cambio orgánico (Figura 57). Se pierden las correlaciones con CE, pero se mantiene que con la disminución del pH hay más P y fosfatasas. Los metales pesados asimilables están ahora mejor relacionados con tiempo de incubación, que en el Tratamiento A, notándose que las cantidades Mn disponible disminuyen mientras que las de Sc aumentan, como ocurre en el total de las variables

Esta pérdida de potasio podría ser atribuida a varias causas: 1, la pérdida de CO supondría una pérdida de la capacidad de cambio del suelo con lo cual se perdería parte del potasio asimilable que en parte está en forma de potasio adsorbido en las paredes de la materia orgánica. 2, el K asimilable en un sistema cerrado y húmedo podría entrar en la interlámina de los minerales de las arcilla y reconstruir la mica aunque no podemos afirmarlo con rotundidad porque no se ha hecho un estudio detallado de la mineralogía.

Tampoco se ve incrementada la CE que si ocurre en A y C hecho que apoya la hipótesis de que el tratamiento B es más adecuado que los demás.

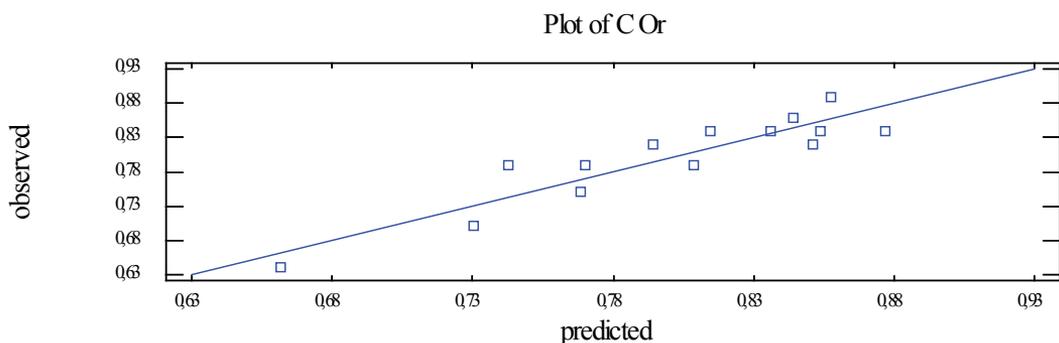
En lo que respecta a las ecuaciones de regresión múltiple, en este tratamiento las variables que mejor se pueden predecir, en función de las variables de ensayo, son el C.O., las actividades fosfatasa básica y arilsulfatasa y el Mn (Tabla 36).

Se aprecia que en todos los casos el grado de significación es bastante alto. Mientras que el C.O. aumenta si la temperatura es alta, el paso del tiempo y el aumento en el riego provocan que disminuya. Las dos actividades, por su parte, se comportan igual en lo que al sentido de la relación se refiere, positiva con los días y negativa con la temperatura y el riego. Finalmente la cantidad de Mn disponible disminuye con el tiempo y las temperaturas altas aunque no con los mL añadidos.

Tabla 36.- Ecuaciones de regresión para el Tratamiento B

Variable de Y	Coeficiente de las variables independientes				Estadísticos			
	ordenada en el origen	DÍAS	Tª	mL totales	R ²	R ² ajustada	SEE	P-value
Corgánico	0,834841	-0,000644	0,0025741	-0,000471	82,8037	77,6488	0,0313855	0,0004
F. Básica	179,639	0,705511	-0,028689	-0,0533005	75,0092	67,5119	11,2815	0,0023
Arilsulfatasa	25,2243	0,108217	-0,248336	-0,0391294	51,609	37,0917	4,52794	0,0554
Mn	8598,92	-61,5199	-187,71	17,6211	63,602	52,6826	685,477	0,0144

Figura 57.- Gráfico de correlación para el CO (mayor R2) $CO = 0,834841 - 0,000644Días + 0,0025741Temperatura - 0,000471mL\ totales$



Tratamiento C

En el tratamiento C, vuelve a aparecer la relación del tiempo y riego con CE, CO, F.básica y metales, pero cambia el sentido de la relación con el C.O. Ahora la humectación es siempre con té (adiciones orgánicas) y la degradación del C.O. no se nota con el tiempo, lo que indica que en buena medida la materia orgánica contenida en el té de compost compost compensa las pérdidas de carbono orgánico que se derivan de la actividad biológica. Tampoco es evidente en este tratamiento la ligazón C.O. y K antes citada lo que podría ser un argumento a favor de la hipótesis de que la pérdida de K disponible en el tratamiento B pudiera deberse en parte a una pérdida de carbono orgánico.

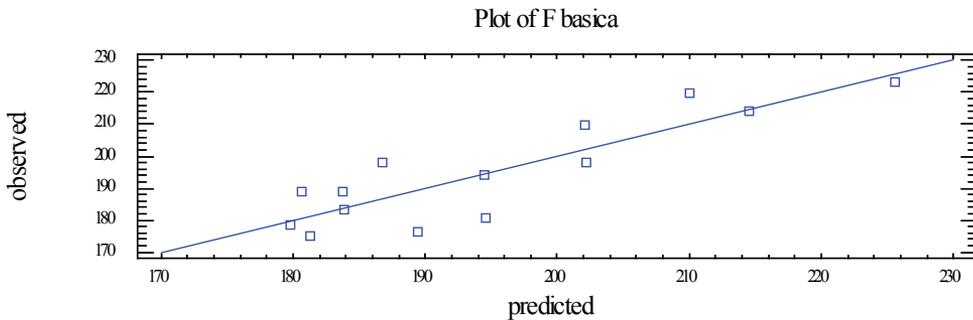
El N, sin embargo, aparece ahora con una serie de correlaciones significativas. Hay más N en los casos de mayor cantidad microbiana en el suelo. De la misma manera al aumentar la fosfatasa del suelo original también aumenta el contenido de P del suelo.

En este caso las ecuaciones de regresión (Tabla 37) muestran un valor predictivo para la CE (Figura 58), que tiene una relación positiva con todas las variables de ensayo. El CO aumenta con el paso de los días y si la temperatura es alta mientras que disminuye con el riego. La actividad fosfatasa básica, al igual que en el tratamiento B, tiene una relación negativa con la temperatura y la adición de agua. Finalmente, los metales pesados Sc y Mn se afectan de la misma manera por la temperatura, negativamente, y los mL de té añadidos, positivamente. Respecto a los días de incubación, el Sc aumenta si pasa el tiempo y el Mn disminuye.

Tabla 37.- Ecuaciones de regresión para el Tratamiento C

Variable de Y	Coeficiente de las variables independientes				Estadísticos			
	ordenada en el origen	DÍAS	T ^a	mL te	R ²	R ² ajustada	SEE	P-value
CE	301,426	4,45371	7,53236	1,35731	53,6024	39,6831	296,903	0,0455
C. orgánico	0,70655	0,00832039	0,00930657	-0,00223928	64,4199	53,7459	0,0898873	0,0129
F. Básica	182,823	0,610654	-0,0104139	-0,0104139	76,3308	69,2301	9,01566	0,0018
Sc	6,0499	0,00570129	-0,444597	0,00468241	63,1462	52,0901	0,509248	0,0153
Mn	6947,18	-46,0808	-77,7125	8,00551	65,9467	55,7307	633,539	0,0105

Figura 58.- Gráfico de correlación para la F. básica (mayor R2) F. básica = $301,426 + 4,45371Días + 7,53236Temperatura + 1,35731mL té$



Tratamiento D

Finalmente, en el tratamiento D (riego intermitente con té) no hay relación de la humectación y tiempo con C.O., pero sí con K (disminución), CE (aumento), F.básica (aumento) y metales (Sc aumenta, Mn disminuye). Todas las relaciones se han comentado ya anteriormente.

Para este último supuesto, las ecuaciones de regresión muestran un valor predictivo para la CE, que tiene una relación positiva con todas las variables de ensayo. El K disminuye el paso de los días y la temperatura mientras que aumenta con las irrigaciones. La actividad fosfatasa básica, tiene una relación negativa con la temperatura y la adición de té, lo que no ocurre con la temperatura y el riego con agua. Finalmente, ambos metales pesados, Sc y Mn se afectan prácticamente igual por todas variables difiriendo únicamente en el transcurso de los días, positivo para el Sc y negativo para el Mn.

Tabla 37.- Ecuaciones de regresión para el Tratamiento D

Variable de Y	Coeficiente de las variables independientes					Estadísticos			
	ordenada en el origen	DÍAS	Tª	mL agua	mL té	R ²	R ² ajustada	SEE	P-value
CE	278,658	8,8065	19,0612	0,743586	-4,14989	69,0263	55,2602	149,686	0,21
K	433,753	-0,81139	-2,73905	0,185821	0,0474818	66,3279	51,3625	12,7335	0,0297
F. Básica	207,413	0,415197	-0,368177	0,0216102	-0,212482	72,6628	60,5129	9,09314	0,0125
Sc	6,10692	0,0201486	-0,0239392	0,00068893	9,69698E-05	96,0652	94,3164	0,162793	0
Mn	6549,81	-36,9948	-77,4817	5,04358	7,19048	69,9704	56,6239	566,428	0,0185

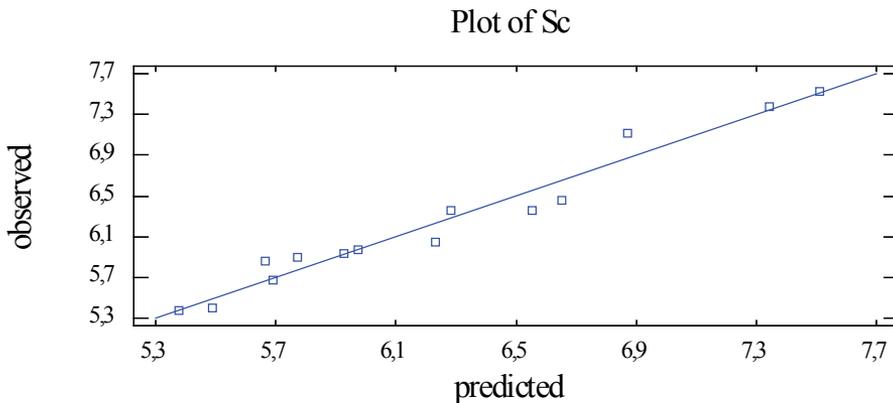


Figura 59.- Gráfico de correlación para el Sc (mayor R2) $Sc = 6,10692 + 0,0201486Días - 0,0239392Temperatura + 0,00068893 mL\ agua + 0,00009698 mL\ té$

Consideraciones finales

En general, los resultados sugieren que la humectación, sin o con té de compost, genera una disminución ligera del pH y aumento sustancial de la CE y de la actividad enzimática, representada por fosfatasas y arisulfatasas, así como una degradación progresiva de la materia orgánica.

La bajada de pH con el tiempo, aunque leve, es más evidente en el tratamiento D a 35°C. El riego con agua y el riego con té de compost disminuyen el pH del suelo, si bien en éste último caso los coeficientes de correlación son más altos. Además esta disminución coincide con el incremento de fosfatasas y arisulfatasas.

Por su parte la CE aumenta con el tiempo de humectación en A, C y D, pero la relación no es significativa en B. El C.O. no muestra un comportamiento regular en los distintos tratamientos puesto que disminuye con el tiempo en A y B, pero aumenta en C y pierde su relación en D.

En lo que a macronutrientes se refiere cabe destacar que la disminución de K con el tiempo de humectación sólo es significativa en B y D mientras que el P aumenta en paralelo al contenido de fosfatasas. Por su

parte, no hay correlaciones significativas del N con agua de riego, pero sí con el té que favorece el consumo de N. La relación agua y enzimas es más baja también que la correspondiente al té con las enzimas.

Con respecto a las variables microbiológicas, recalcar que el descenso en el número de microorganismos aerobios mesófilos presentes en el suelo sólo ocurre en el tratamiento A (control), pero no cuando se adiciona té y que la fosfatasa básica siempre aumenta con el tiempo de humectación, independientemente del tratamiento y temperatura.

Finalmente y centrándonos en los metales pesados destacar que la entrada de Sc y Mn en las tablas de correlación aparece cuando se adiciona té (tratamiento B, 21 °C). Sus coeficientes se hacen más altos en C y D. El Sc se acumula en el tiempo mientras que el Mn disminuye. Además, se observan pocas relaciones de los metales con el pH y cuando ocurre son discrepantes (pHagua-Sc en D-35 °C = -0,74; pHClK-Sc en B-35 °C = 0,82), por lo que la disponibilidad de metales no parece ser dependiente del pH.

3.4. Análisis de la biodiversidad microbiana en los microsistemas edáficos ensayados

De manera complementaria se realizó un estudio de biodiversidad sobre ciertas poblaciones microbianas de interés sobre algunos de los microcosmos. Dichas poblaciones son:

- * Bacterias Totales
- * Bacterias oxidadoras de amonio
- * Arqueas oxidadoras de amonio
- * Bacterias del fósforo

La técnica empleada fue la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización o DGGE. Dicha técnica permite separar fragmentos

de ADN, previamente amplificados por PCR, en función de su gradiente de desnaturalización y así obtener a partir de un perfil de bandas la distribución de los distintos grupos bacterianos estudiados. Los resultados obtenidos son:

Tal y como se observa en el árbol filogenético resultante del análisis de la biodiversidad general (Figura 60), los microcosmos estudiados se agrupan en dos grandes clusters. Uno de ellos agrupa todos los microcosmos correspondientes al tratamiento A (irrigaciones con agua destilada) y los microcosmos del tratamiento B (un único riego con té de compost al principio de la experiencia) que se examinaron tras 4 y 8 días y tratamiento. En el otro cluster, es interesante resaltar como los suelos regados únicamente con té (Tratamiento C) muestran una gran similitud entre sí, difiriendo del resto de perfiles. En rasgos generales se puede concluir que el tipo de tratamiento y el tiempo de incubación son los parámetros que más afectan a la biodiversidad general y no tanto la temperatura.

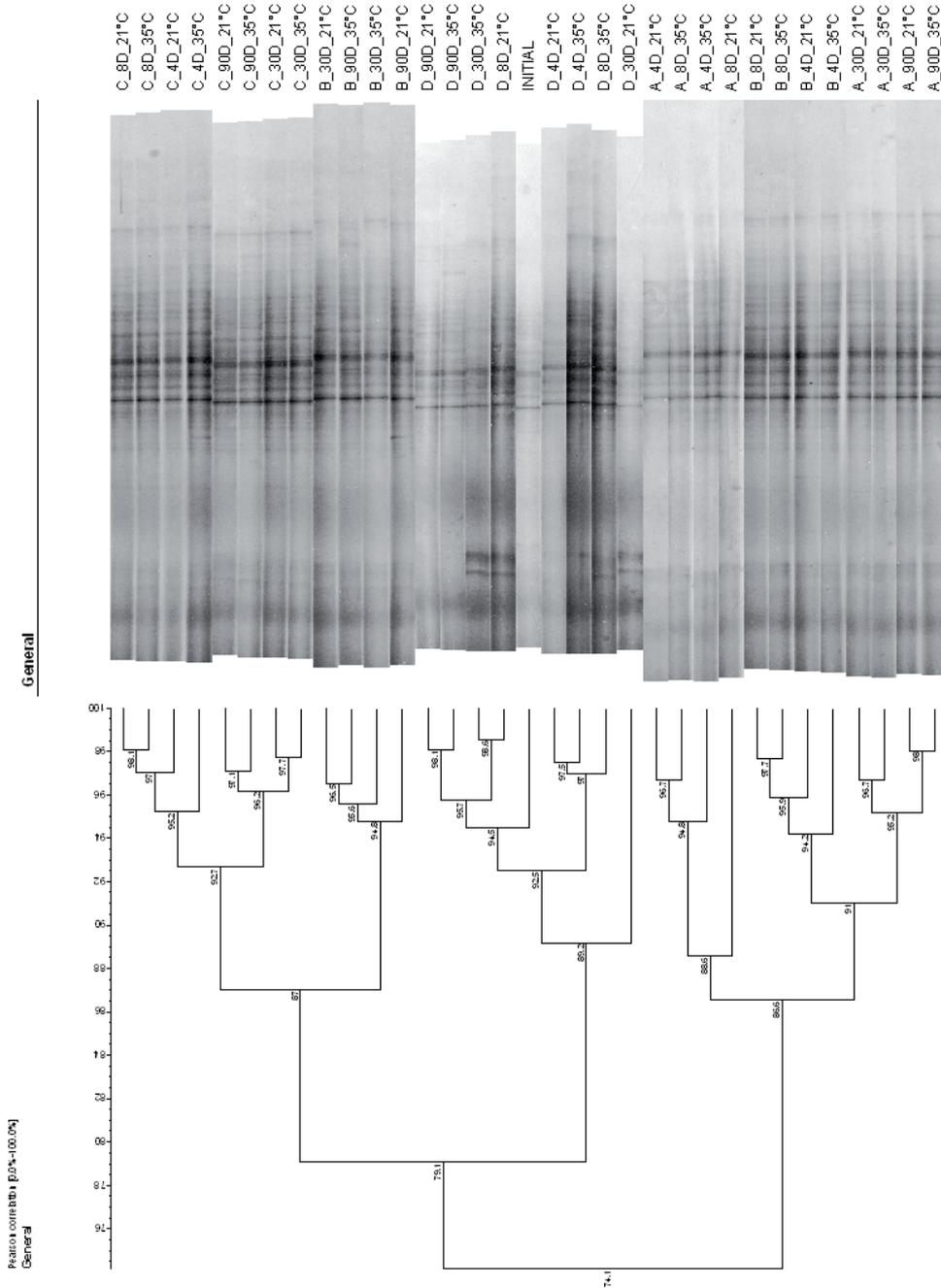


Figura 60.- Perfiles del DGGE correspondientes a la amplificación del gen 16S rRNA (Bacterias totales). La nomenclatura de cada perfil se compone por una letra (A, B, C, D) que hace referencia al tipo de tratamiento; un código alfa-numérico (4D, 8D, 30D, 90D) que hace referencia al tiempo de incubación y finalmente la temperatura (21 o 35 °C) de incubación

En este gel se distinguen dos grades clusters, el primero de ellos que incluye los microcosmos del tratamiento A y el segundo de ellos los microcosmos restantes que muestran cierto grado de similitud para cada tipo de tratamiento. Es significativo del análisis de la imagen la mayor cantidad de bandas que se observan en los perfiles del tratamiento B, C y D (suelos tratados con más o menos té de compost en función del tratamiento) que permite concluir la influencia positiva del té de compost sobre el número de poblaciones de bacterias oxidadoras de amonio.

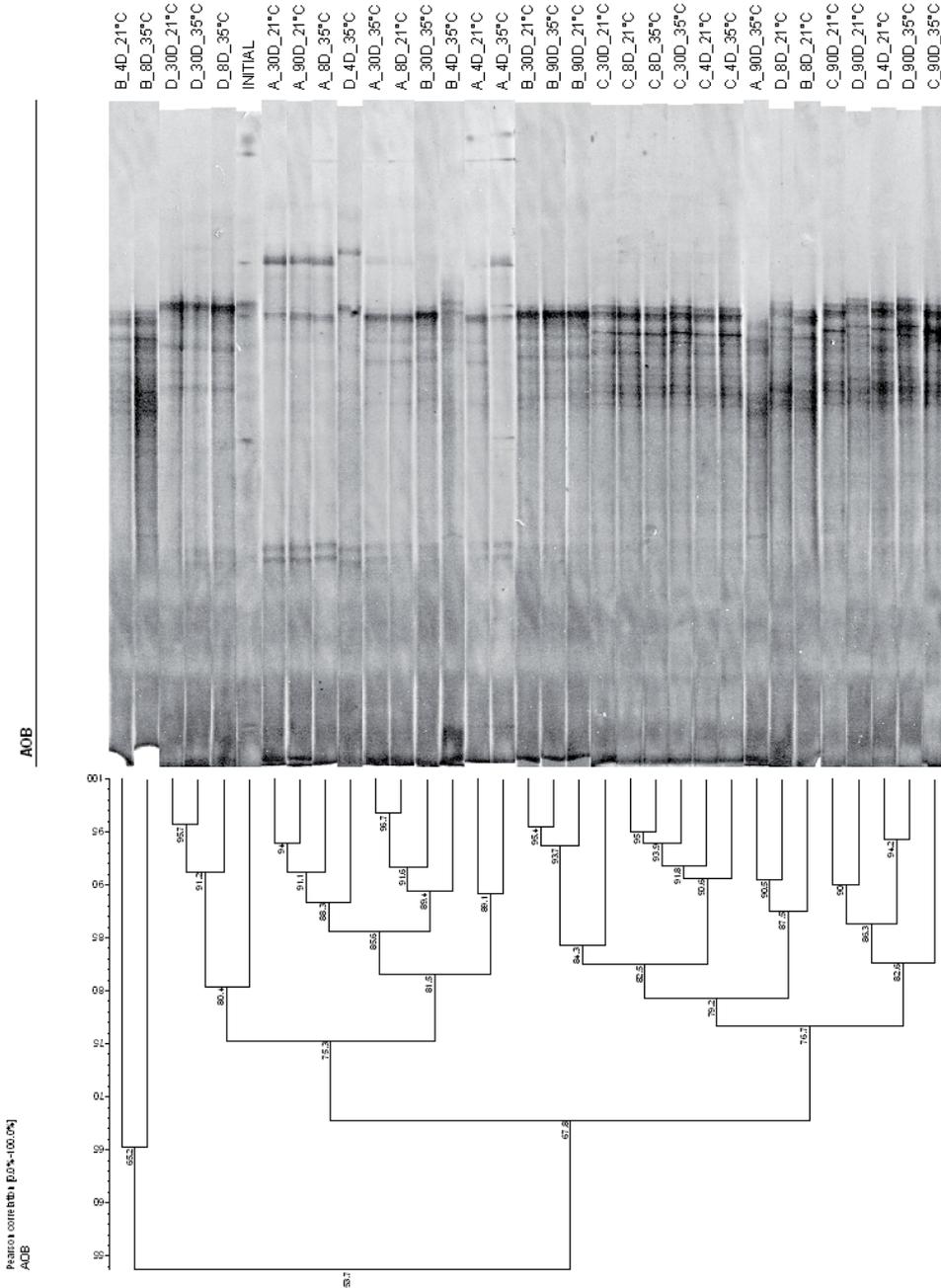


Figura 61: Perfiles del DGGE correspondientes a la amplificación del gen 16S rRNA (bacterias oxidadoras de amonio). La nomenclatura de cada perfil se compone por una letra (A, B, C, D) que hace referencia al tipo de tratamiento; un código alfa-numérico (4D, 8D, 30D, 90D) que hace referencia al tiempo de incubación y finalmente la temperatura (21 o 35 °C) de incubación

En este caso es manifiestamente apreciable, la agrupación homogénea de los perfiles según el tipo de tratamiento aplicado (Figura 62). Se observa claramente como ciertas bandas aparecen únicamente en los perfiles de los microcosmos tratados, en mayor o menor medida, con té de de compost. De igual modo, existen bandas que desaparecen o se atenúan cuando el suelo ha sido regado con té de compost. Este comportamiento puede ser debido a la sensibilidad de dicha población(es) a alguno de los componentes presentes en el té de compost (por ejemplo metales pesados).

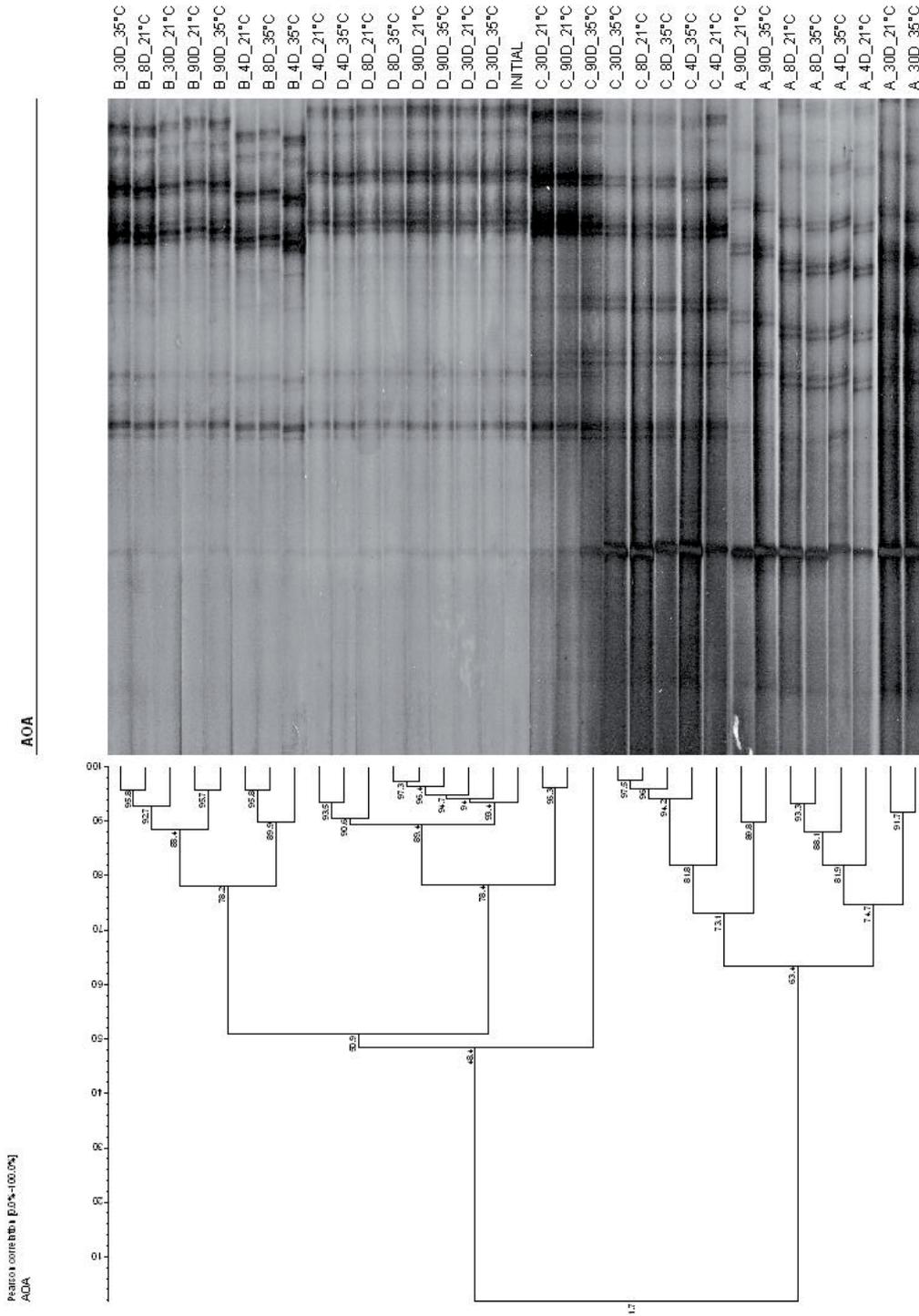


Figura 62: Perfiles del DGGE correspondientes a la amplificación del gen Arch-amoA (arqueas oxidadoras de amonio). La nomenclatura de cada perfil se compone por una letra (A, B, C, D) que hace referencia al tipo de tratamiento; un código alfa-número (4D, 8D, 30D, 90D) que hace referencia al tiempo de incubación y finalmente la temperatura (21 o 35 °C) de incubación

En este último caso no parece existir una correspondencia clara entre ninguno de los parámetros estudiados y la agrupación de los perfiles. Del estudio del árbol no se es posible extraer una conclusión clara pues las muestras no se organizan en grandes cluster que permitan discernir algún tipo de agrupamiento. Igualmente ocurre con el análisis de la imagen. Según la distribución de las bandas en los perfiles se entiende que ninguna de las poblaciones permanece constante ni a lo largo del tiempo ni está influida por ninguno de los tratamientos.

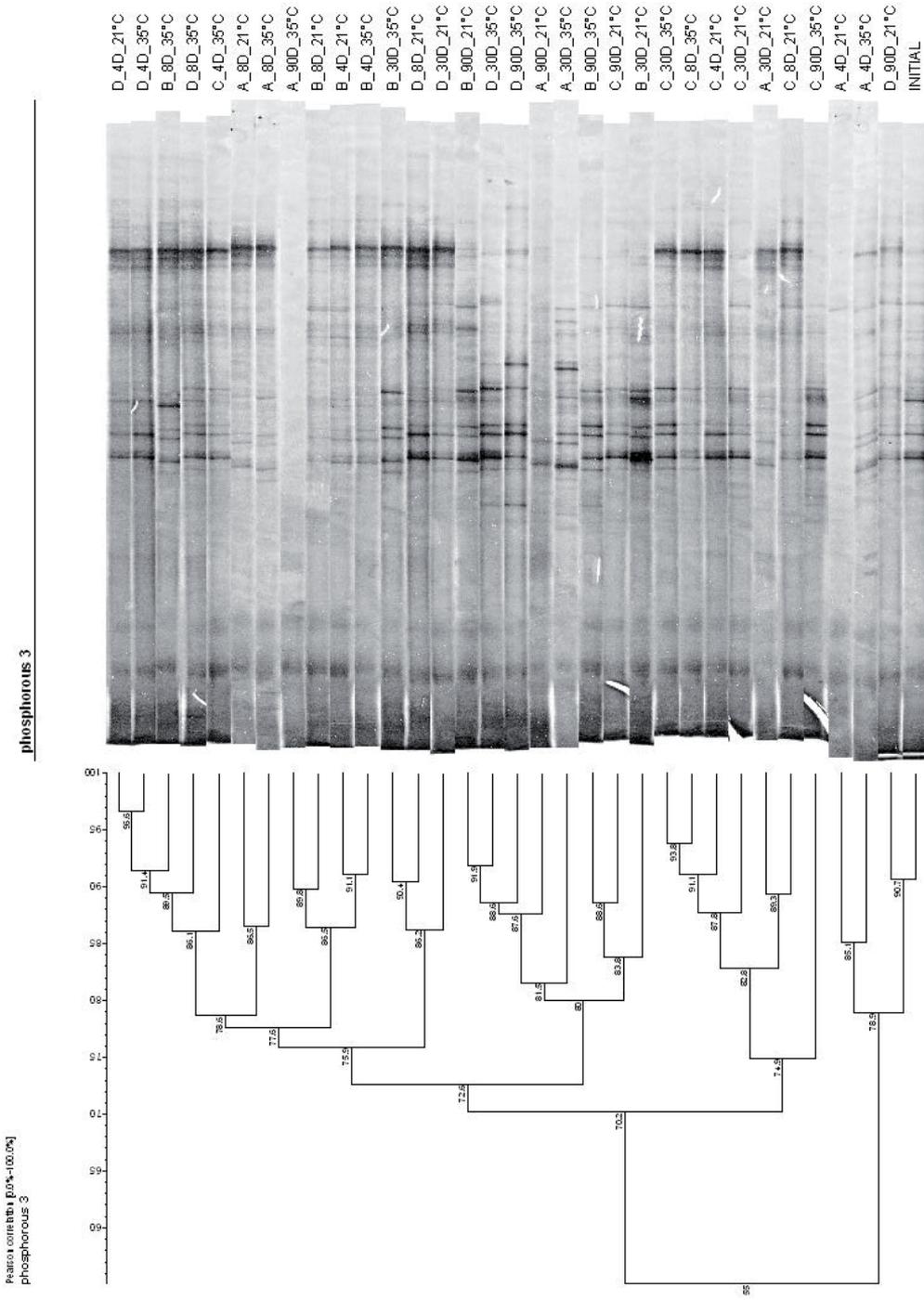


Figura 63: Perfiles del DGGE correspondientes a la amplificación del gen 16S rRNA (Bacterias del fósforo). La nomenclatura de cada perfil se compone por una letra (A, B, C, D) que hace referencia al tipo de tratamiento; un código alfanumérico (4D, 8D, 30D, 90D) que hace referencia al tiempo de incubación y finalmente la temperatura (21 o 35 °C) de incubación

3.5. Otras enmiendas

Resulta interesante en este punto, comparar los resultados obtenidos en este estudio en microcosmos con los resultados obtenidos por Pérez-Lomas et al. (2010). En sus experimentos, Pérez-Lomas et al. (2010), estudiaron la influencia de la adición de compost de lodos de depuradora (el mismo compost empleado en este estudio para la elaboración del té de compost), sobre distintos suelos de la región mediterránea, uno de los cuales es el usado también en estos experimentos.

Pérez-Lomas et al. (2010) observaron, al igual que ocurre cuando se riega con té de compost, como la adición de compost sobre el suelo, proporcionó materia orgánica, los nutrientes N, P y K y otros elementos beneficiosos como los carbonatos.

Al igual que se ha demostrado en el presente trabajo, se encontró en el suelo adicionado un aumento en la actividad biológica y enzimática tras la adición de compost.

En lo referente a metales pesados y en el ensayo de esta memoria, se ha detectado que aunque ocurren variaciones en las cantidades de metales pesados asimilables, éstas no son significativas, ya que las cantidades adicionados mediante el riego con té de compost son muy pequeñas. Los estudios de Pérez-Lomas et al. (2010) sin embargo, si revelaron un incremento significativo en las cantidades de Mo, As, Zn y Sb.

Resulta también interesante, destacar el efecto de la temperatura sobre las propiedades del suelo. Mientras que Pérez-Lomas et al. (2010), detectaron cambios significativos en varios parámetros como la cantidad de N, P, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico o la conductividad eléctrica, en la presente memoria, la propiedad más influida es la actividad enzimática arilsulfatasa. Sí coinciden ambos experimentos, no obstante, en la destacable disminución en la cantidad de ciertos metales pesados asimilables cuando la temperatura es de 35 °C.

En otros estudios realizados sobre aplicación de compost obtenido a partir de lodos de depuradora, realizados por Knight et al. (1997); Criquet et al., (2008) y sobre la aplicación de lodos, elaborados por Kizilkaya R. et al (2005), se puso de manifiesto que suponía un decrecimiento sobre la población microbiana, o simplemente esta no se veía afectada por la aplicación de enmendantes biológicos.

Por el contrario, Larkin R.P. et al., (2008) obtuvieron resultados positivos tras la aplicación de té de compost sobre las poblaciones microbianas, coincidiendo con otros autores como Sastre et al., (1996); Kizilkaya R. et al, (2005); Criquet et al.,(2008) en suelos tratados con lodos de depuradoras y con Perucci (1990); Albiach et al.,(2000), con el uso de compost obtenido a partir de lodos.

Existen otros estudios en los que se analiza la respuesta del suelo cuando a éste se le adicionan otros tipos de enmiendas orgánicas diferentes del compost o té de compost. Así, López-Piñeiro et al. (2007), llevaron a cabo un estudio de campo en condiciones mediterráneas semiáridas para evaluar los cambios en la materia orgánica después de cuatro adiciones anuales consecutivas con los residuos acuosos de una almazara y el alpeorujo en dos suelos de olivar. Es destacable como la adición de los restos de almazara disminuyó significativamente el contenido de P de ambos suelos. No obstante, el K disponible se elevó en un 26% y un 140% respectivamente.

3.6. Anexo de tablas

Tabla 31a.- Evolución de las propiedades físicoquímicas del suelo adicionado según el Tratamiento A

Tiempo muestreo días	Tª	Riego agua mL	Riego té mL	Riego Total mL	pH _{H₂O} (1:1)	pHKCl (1:1)	CE (25°C)	Ca CO ₃ %	C.O. %	N total %	P (ppm)	K (ppm)
SUELO INICIAL		0	0	0	8	7,9	450	43,5	0,71	0,11	3,02	
4	21	69	0	69	8,0	7,4	438	43,51	1,00	0,088	14,86	356,73
8	21	69	0	69	8,1	7,6	490	41,89	1,08	0,099	13,13	402,89
15	21	94	0	94	8,2	7,6	475	41,27	0,84	0,060	15,53	367,79
30	21	119	0	119	8,0	7,5	473	40,77	0,82	0,082	17,92	379,75
45	21	143	0	143	8,1	7,5	513	44,58	0,80	0,125	15,26	390,68
60	21	168	0	168	8,0	7,5	562	40,35	0,85	0,063	16,07	380,59
90	21	218	0	218	8,0	7,4	867	39,44	0,71	0,056	16,72	401,91
4	35	93	0	93	8,2	7,4	516	42,04	1,04	0,082	12,2	349,87
8	35	128	0	128	8,0	7,5	585	40,63	1,07	0,115	13,7	377,33
15	35	132	0	132	8,4	7,6	459	38,28	0,90	0,044	16,8	386,90
30	35	204	0	204	7,8	7,5	677	41,58	0,73	0,082	19,29	394,87
45	35	282	0	282	7,8	7,4	990	41,67	0,77	0,049	17,28	394,18
60	35	326	0	326	8,0	7,5	882	40,88	0,77	0,126	35,16	360,54
90	35	372	0	372	8,0	7,4	1031	38,32	0,71	0,057	7,43	370,56

Tabla 31b.- Evolución de las propiedades biológicas del suelo adicionado según el Tratamiento A

Tiempo muestreo días	Tª	Recuento Bact UFC/gr	F. ÁCIDA mg p-nitrof	F. BÁSICA mg p-nitrof	ARISULFASA mg p-nitrof
SUELO INICIAL		7,4E+04	15,121	69,364	4,515
4	21	7,5E+05	39,394	177,939	16,636
8	21	5,5E+05	13,485	166,000	13,136
15	21	5,6E+05	39,667	193,939	19,485
30	21	5,5E+05	42,303	178,424	14,879
45	21	5,0E+05	44,485	206,455	16,970
60	21	2,4E+05	30,788	228,394	22,182
90	21	4,1E+05	65,364	225,727	15,727
4	35	2,4E+05	40,273	190,667	17,045
8	35	3,6E+05	37,955	173,909	7,864
15	35	1,4E+05	33,091	179,424	13,576
30	35	5,0E+05	32,909	176,303	6,939
45	35	5,7E+05	41,727	195,273	9,788
60	35	1,5E+05	24,455	221,152	12,182
90	35	4,9E+05	55,121	217,409	10,273

Tabla 31c.- Evolución del contenido en metales pesados del suelo adicionado según el Tratamiento A

Tiempo muestreo días	T ^a	Be (ppb)	Sc (ppb)	V (ppb)	Cr (ppb)	Mn (ppb)	Co (ppb)	Ni (ppb)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	As (ppb)	Y (ppb)	Mo (ppb)	Cd (ppb)	In (ppb)	Sn (ppb)	Sb (ppb)	Ba (ppb)	Tl (ppb)	Pb (ppb)	Bi (ppb)	Th (ppb)	U (ppb)
SUELO INICIAL			36	34,5	361,7	9,9	21,4	47,9	45,6	6,3				0,2			144,3		61,9				
4	21	0,008	4,088	65,308	109,938	6432,28	54,148	350,938	5034,07	199,686	24,364	67,328	1,878	5,46	0,008	60,118	10,988	3186,398	0,088	1109,164	2,184	2,7	0,988
8	21	ND	4,238	68,808	121,828	4568,86	33,338	323,748	4307,72	176,636	23,974	65,958	1,488	6,24	0,008	67,038	11,428	3302,568	0,068	1162,704	2,124	2,41	0,818
15	21	0,018	4,188	67,298	116,038	5879,1	46,988	351,778	5278,13	177,776	24,264	69,778	1,768	5,87	0,018	0,058	10,948	3391,258	0,118	1227,954	2,474	2,23	0,988
30	21	ND	4,318	68,328	121,448	4789,54	35,898	317,318	4661,25	162,226	23,234	63,188	1,528	7,69	0,018	15,778	11,438	3192,688	0,108	1235,494	2,144	2,14	0,908
45	21	0,008	4,998	78,678	140,608	5253,15	38,358	315,148	5043,55	180,206	25,794	67,758	1,648	6,03	0,018	ND	12,678	3523,838	0,108	1265,344	2,244	2,36	0,698
60	21	ND	4,268	70,578	123,348	3994,06	27,598	267,708	4526,04	159,296	22,044	58,598	1,478	6,74	0,008	ND	12,178	3202,338	0,098	1128,424	1,934	1,99	0,518
90	21																						
4	35	ND	4,858	75,798	130,988	5861,41	45,348	365,168	5049,37	247,786	25,974	69,798	1,788	6,14	0,018	4,988	11,388	3369,878	0,088	1159,614	2,984	3,51	0,788
8	35	0,008	4,108	66,378	109,548	4088,6	30,078	291,458	4439,47	185,326	23,704	59,758	1,348	5,81	0,008	11,858	11,528	3174,938	0,078	1408,794	2,234	2,33	0,768
15	35	0,008	4,438	71,968	127,198	4851,63	36,268	303,088	4478,42	204,126	24,724	62,878	1,668	6,35	0,008	57,178	12,148	3311,378	0,068	1221,254	2,084	2,24	1,138
30	35	0,018	4,308	72,048	124,908	4904,85	36,158	273,458	4497,62	162,856	24,314	59,788	1,468	6,8	0,008	35,418	12,718	3288,888	0,058	1265,824	2,034	2,09	0,838
45	35	ND	4,068	71,058	117,608	4920,46	36,798	256,348	4385,81	182,356	23,614	57,328	1,668	6,91	0,008	46,738	13,748	3219,548	0,088	2692,074	1,974	1,95	0,858
60	35	ND	4,228	71,738	121,838	4523,83	32,208	248,808	4396,89	155,156	23,494	58,258	1,728	5,78	0,018	ND	15,158	3247,078	0,068	1235,124	1,994	2,13	0,988
90	35	0,018	4,178	73,888	123,808	4610,51	33,508	240,978	4294,99	163,956	23,464	51,298	1,698	5,64	0,008	3,738	13,328	3229,168	0,078	1163,294	1,704	1,83	0,548

Tabla 32a.- Evolución de las propiedades fisicoquímicas del suelo adicionado según el Tratamiento B

Tpo muestreo días	T ^a	Riego agua mL	Riego té mL	Riego Total mL	pH H ₂ O (1:1)	pH KCl (1:1)	CE (25°C)	Ca CO ₃ %	C.O. %	N total %	P (ppm)	K (ppm)
SUELO INICIAL		0	0	0	8	7,9	450	43,5	0,71	0,11	3,02	
4	21	0	69	69	7,9	7,4	763	39,09	0,84	0,062	31,94	472,69
8	21	0	69	69	7,9	7,5	893	39,75	0,82	0,070	38,02	453,73
15	21	23	69	92	8,1	7,5	521	38,86	0,84	0,070	23,67	478,88
30	21	48	69	117	8,0	7,5	468	40,43	0,84	0,066	25,7	449,10
45	21	71	69	140	8,0	7,4	480	39,00	0,82	0,289	33,06	449,48
60	21	101	69	170	8,0	7,4	714	38,51	0,79	0,145	37,37	451,38
90	21	145	69	214	8,0	7,5	1059	41,46	0,70	0,066	21,2	352,77
4	35	28	69	97	7,9	7,4	394	42,92	0,84	0,078	16,82	380,21
8	35	63	69	132	8,0	7,5	829	42,81	0,89	0,038	25,77	475,32
15	35	82	69	151	8,1	7,6	1023	39,31	0,86	0,059	35,32	463,89
30	35	137	69	206	8,0	7,5	669	39,75	0,79	0,066	28,665	456,29
45	35	202	69	271	7,9	7,5	536	38,11	0,75	0,150	33,56	431,53
60	35	236	69	305	8,0	7,5	735	38,45	0,79	0,110	25,27	455,89
90	35	367	69	436	8,0	7,5	1168	42,23	0,64	0,053	23,22	323,77

Tabla 32b.- Evolución de las propiedades biológicas del suelo adicionado según el Tratamiento B

Tpo muestreo días	Tª	Recuento Bact UFC/gr	F. ÁCIDA mg p-nitrof	F. BÁSICA mg p-nitrof	ARISULFASA mg p-nitrof
SUELO INICIAL		7,4E+04	15,121	69,364	4,515
4	21	2,5E+05	47,758	175,909	13,818
8	21	8,2E+05	32,212	177,212	13,818
15	21	6,1E+05	41,758	193,848	20,212
30	21	4,5E+05	41,439	182,167	22,606
45	21	4,6E+05	51,333	207,636	22,576
60	21	3,2E+05	30,255	223,782	24,982
90	21	5,0E+05	43,273	224,068	15,242
4	35	2,7E+06	39,576	170,606	11,121
8	35	3,5E+05	30,333	178,424	10,061
15	35	6,3E+05	35,909	197,697	14,758
30	35	3,6E+05	41,964	170,379	10,985
45	35	3,8E+05	49,788	192,970	11,136
60	35	3,6E+05	25,682	217,485	17,545
90	35	4,6E+05	37,750	215,500	4,864

Tabla 32c.- Evolución del contenido en metales pesados del suelo adicionado según el Tratamiento B

Tpo muestreo días	Tª	Be (ppb)	Sc (ppb)	V (ppb)	Cr (ppb)	Mn (ppb)	Co (ppb)	Ni (ppb)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	As (ppb)	Y (ppb)	Mo (ppb)	Cd (ppb)	In (ppb)	Sn (ppb)	Sb (ppb)	Ba (ppb)	Tl (ppb)	Pb (ppb)	Bi (ppb)	Th (ppb)	U (ppb)
SUELO INICIAL				36	34,5	361,7	9,9	21,4	47,9	45,6	6,3			0,2			144,3		61,9				
4	21	0,018	4,728	75,448	131,588	6739,05	59,348	353,798	5173,94	145,486	27,034	65,408	2,498	5,47	0,008	4,058	12,188	3475,288	0,098	1585,154	2,364	2,17	0,788
8	21	0,008	4,668	75,638	137,818	4860,66	37,578	323,688	4963,23	150,586	25,514	63,778	2,088	5,75	0,018	30,718	11,588	3368,528	0,088	1228,404	2,154	2,03	0,528
15	21	0,008	6,083	88,193	174,378	5049,24	42,788	336,573	4521,665	115,076	23,854	58,543	1,963	17,78	0,013	13,933	10,753	3290,138	0,098	1098,239	1,989	1,865	0,823
30	21	0,013	6,393	91,753	187,098	4165,45	34,923	216,538	4476,325	107,906	23,854	58,058	1,933	17,8	0,008	20,378	11,598	3349,228	0,108	1119,704	2,029	1,885	0,783
45	21	0,008	5,108	78,808	145,868	4471,85	34,368	284,608	4491,46	120,196	24,284	57,138	1,858	5,89	0,008	38,158	12,508	3287,658	0,108	1139,924	1,994	1,9	0,568
60	21	0,038	5,398	83,788	162,658	4129,12	30,228	389,408	4658,91	149,986	24,114	60,108	2,048	19,43	0,008	56,418	13,288	3379,768	0,108	1198,764	2,174	1,97	0,448
90	21	0,028	6,788	100,108	207,378	3028,2	24,628	273,048	4273,8	93,406	23,744	51,448	1,658	6,32	0,008	16,148	12,478	3322,068	0,098	1086,834	1,834	1,64	0,448
4	35	ND	0,458	19,948	6,558	2469,91	20,958	154,398	2502,68	51,336	5,134	30,718	0,918	4,08	0,008	17,188	6,198	1537,868	0,038	607,104	1,334	1,08	0,298
8	35	0,008	4,418	72,588	127,218	3985,08	29,388	290,638	4769,6	150,496	24,374	61,368	2,028	7,64	0,018	30,138	12,058	3343,158	0,068	1307,074	2,284	2,02	0,528
15	35	0,048	6,353	91,993	184,018	3875,29	33,023	298,748	4320,8	153,841	23,894	55,073	1,958	18,15	0,008	38,673	14,273	3245,513	0,068	1150,784	1,959	1,865	0,738
30	35	ND	5,198	84,118	154,888	4553,03	34,918	268,218	4564,53	141,776	25,834	58,558	2,128	5,35	0,008	16,848	13,708	3424,358	0,078	1256,104	2,084	2,06	0,568
45	35	ND	4,898	79,918	145,048	4280,55	31,578	257,458	4190,15	105,776	23,964	52,708	2,038	5,14	0,018	5,788	12,968	3274,758	0,078	1170,654	1,914	1,84	0,568
60	35	0,008	5,528	83,228	153,948	4263,92	32,578	255,778	4471,69	132,246	24,704	55,708	2,188	6,8	0,008	14,958	13,398	3373,808	0,078	1261,594	2,254	1,99	0,608
90	35	0,028	6,778	101,638	208,628	3431,25	28,688	254,828	3795,04	93,746	23,424	46,408	1,788	5,42	0,008	72,008	12,878	3288,668	0,088	1098,624	1,654	1,68	0,468

Tabla 33a.- Evolución de las propiedades físicoquímicas del suelo adicionado según el Tratamiento C

Tpo muestreo días	Tª	Riego agua mL	Riego té mL	Riego Total mL	pHH ₂ O (1:1)	pHKCl (1:1)	CE (25°C)	Ca CO ₃ %	C.O. %	N total %	P (ppm)	K (ppm)
SUELO INICIAL		0	0	0	8	7,9	450	43,5	0,71	0,11	3,02	
4	21	0	69	69	7,9	7,4	809	38,77	0,82	0,094	27,97	399,91
8	21	0	69	69	8,0	7,6	770	38,87	0,82	0,068	34,78	378,14
15	21	0	92	92	8,0	7,5	523	40,10	0,85	0,080	32,07	323,70
30	21	0	117	117	7,9	7,4	648	38,24	0,79	0,054	12,9	358,15
45	21	0	145	145	7,9	7,4	611	40,55	1,00	0,058	16,53	367,16
60	21	0	169	169	7,9	7,4	854	39,92	0,94	0,060	26,82	361,48
90	21	0	219	219	8,1	7,6	1319	39,62	1,22	0,065	25,03	349,46
4	35	0	94	94	7,9	7,4	525	38,72	0,82	0,114	28,4	380,90
8	35	0	122	122	8,0	7,5	1084	38,76	0,83	0,039	34,36	397,85
15	35	0	142	142	8,0	7,6	1118	39,85	0,82	0,063	32,22	319,70
30	35	0	208	208	7,9	7,4	690	36,82	0,79	0,055	33,52	366,26
45	35	0	284	284	7,9	7,4	953	39,12	0,77	0,052	30,88	369,80
60	35	0	312	312	7,8	7,4	887	38,23	1,03	0,062	22,77	370,41
90	35	0	420	420	8,1	7,5	1968	40,92	0,72	0,043	27,1	364,79

Tabla 33b.- Evolución de las propiedades biológicas del suelo adicionado según el Tratamiento C

Tpo muestreo días	Tª	Recuento Bact UFC/gr	F. ÁCIDA mg p-nitrof	F. BÁSICA mg p-nitrof	ARISULFASA mg p-nitrof
SUELO INICIAL		7,4E+04	15,121	69,364	4,515
4	21	1,3E+06	41,121	175,273	13,333
8	21	4,4E+05	26,152	188,909	14,212
15	21	7,7E+05	44,879	198,242	21,000
30	21	4,1E+05	44,576	180,788	18,152
45	21	8,4E+05	62,333	197,848	18,303
60	21	3,9E+05	40,523	219,939	20,182
90	21	4,4E+05	42,045	223,136	13,136
4	35	2,1E+06	43,273	178,485	13,970
8	35	5,3E+05	23,121	189,000	10,591
15	35	8,4E+05	33,606	183,455	16,515
30	35	3,3E+05	34,864	176,167	11,742
45	35	5,9E+05	48,667	194,061	13,939
60	35	3,2E+05	24,636	209,697	15,000
90	35	5,8E+05	37,886	213,977	3,886

Tabla 33c.- Evolución del contenido en metales pesados del suelo adicionado según el Tratamiento C

Tª	Be (ppb)	Sc (ppb)	V (ppb)	Cr (ppb)	Mn (ppb)	Co (ppb)	Ni (ppb)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	As (ppb)	Y (ppb)	Mo (ppb)	Cd (ppb)	In (ppb)	Sn (ppb)	Sb (ppb)	Ba (ppb)	Tl (ppb)	Pb (ppb)	Bi (ppb)	Th (ppb)	U (ppb)
21	0,038	5,468	88,028	169,058	6868,15	61,318	369,598	5086,4	162,706	28,054	66,718	2,648	7,49	0,008	29,878	12,968	3670,628	0,108	1266,874	2,834	2,18	0,738
21	ND	5,038	80,018	148,658	4697,74	37,108	327,178	4712,39	130,226	24,034	62,898	1,928	5,63	0,008	15,808	11,188	3427,238	0,078	1221,754	2,194	2,02	0,578
21	0,023	6,713	97,123	198,798	5084,8	44,698	338,268	4381,03	126,566	24,394	58,198	2,108	14,785	0,013	17,848	11,398	3315,703	0,093	1094,219	2,499	1,855	0,653
21	ND	5,698	78,728	146,788	4493,89	35,798	305,488	4378,96	187,096	23,274	56,398	2,918	8,71	0,028	120,628	12,628	3299,288	0,128	1138,414	2,914	3,71	0,578
21	0,008	5,758	84,558	159,778	4576,08	36,918	301,458	4367,25	153,776	24,254	53,848	2,458	7,32	0,008	67,138	12,848	3271,538	0,098	1098,634	2,074	1,94	0,608
21	ND	5,738	86,648	168,928	3961,42	30,188	291,488	4374,9	245,626	25,154	54,498	2,778	6,12	0,008	36,318	13,338	3405,708	0,098	1175,834	2,084	1,88	0,518
21	ND	6,958	104,748	217,278	2956,93	24,778	279,828	3999,86	98,606	23,444	47,528	2,348	5,63	0,008	24,828	12,448	3313,858	0,088	1047,024	1,724	1,58	0,448
35	ND	5,108	81,268	151,798	5776,84	47,748	339,038	4852,73	139,746	25,814	61,428	2,508	5,71	0,008	18,318	12,138	3475,688	0,088	1212,784	2,254	1,95	0,608
35	0,018	4,908	79,708	142,128	4063,69	31,838	292,308	4364,25	128,276	24,164	56,658	2,008	5,34	0,018	ND	12,188	3326,678	0,068	1174,004	2,054	2,07	0,428
35	0,008	5,398	85,448	161,828	4452,92	36,298	299,388	4336,55	176,946	25,454	55,578	2,498	5,94	0,008	62,338	13,048	3392,238	0,068	1196,364	2,354	1,87	0,508
35	0,008	5,558	91,128	172,878	4388,04	34,328	281,578	4266,99	160,006	27,034	53,048	2,868	6,77	0,008	45,278	13,408	3410,528	0,068	1188,954	2,214	1,9	0,498
35	0,008	5,468	84,198	148,278	4560,85	36,458	277,108	4116,64	162,426	25,564	48,978	3,258	6,18	0,008	89,098	13,838	3299,798	0,078	1136,074	2,204	1,95	0,558
35	0,008	6,843	102,593	201,843	3763,845	32,528	279,278	3870,555	140,606	25,594	45,683	3,158	15,875	0,008	16,278	13,208	3218,213	0,063	1101,984	1,804	1,675	0,663
35	0,018	7,018	110,958	222,318	3636,87	30,798	289,958	3929,04	116,536	29,224	41,878	4,088	10,03	0,008	23,148	13,968	3182,918	0,058	1096,724	1,724	1,52	0,468

Tabla 34a.- Evolución de las propiedades físicoquímicas del suelo adicionado según el Tratamiento D

Tpo muestreo días	Tª	Riego agua mL	Riego té mL	Riego Total mL	pH H ₂ O (1:1)	pH KCl (1:1)	CE (25°C) $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	Ca CO ₃ %	C.O. %	N total %	P (ppm)	K (ppm)
SUELO INICIAL		0	0	0	8	7,9	450	43,5	0,71	0,11	3,02	
4	21	0	69	69	8,1	7,5	363	41,36	1,08	0,055	35,8	371,76
8	21	0	69	69	8,0	7,5	718	40,67	1,11	0,043	25,27	389,68
15	21	22	74	96	8,0	7,5	495	39,55	1,09	0,057	10,74	363,56
30	21	23	73	96	7,9	7,5	517	38,52	1,09	0,071	18,09	365,29
45	21	46	97	143	8,0	7,4	640	42,91	1,01	0,065	21,72	356,98
60	21	70	94	164	8,0	7,5	604	45,50	0,76	0,055	26,63	326,04
90	21	120	97	217	8,0	7,5	1048	39,88	1,18	0,067	20,8	335,27
4	35	29	69	98	8,1	7,5	829	41,67	1,06	0,062	31,67	350,37
8	35	75	69	144	8,2	7,7	553	40,84	1,03	0,053	45,04	336,59
15	35	125	79	204	8,1	7,6	527	38,24	0,99	0,061	18,31	348,48
30	35	136	96	232	8,0	7,5	727	41,28	1,01	0,063	18,46	351,52
45	35	140	134	274	8,0	7,4	774	41,81	0,98	0,066	18,62	341,45
60	35	235	109	344	8,0	7,5	727	41,28	0,88	0,056	29,15	322,46
90	35	367	89	456	8,0	7,4	1203	40,11	1,25	0,062	16,99	346,19

Tabla 34b.- Evolución de las propiedades biológicas del suelo adicionado según el Tratamiento D

Tpo muestreo días	Tª	Recuento Bact UFC/gr	F. ÁCIDA mg p-nitrof	F. BÁSICA mg p-nitrof	ARISULFASA mg p-nitrof
SUELO INICIAL		7,4E+04	15,121	69,364	4,515
4	21	1,6E+06	41,939	178,091	13,045
8	21	7,3E+05	35,030	186,242	16,152
15	21	9,0E+05	41,364	199,212	24,273
30	21	5,3E+05	47,333	191,848	18,788
45	21	2,2E+06	85,636	194,697	20,848
60	21	3,7E+05	38,273	219,015	24,659
90	21	4,7E+05	55,636	217,614	15,659
4	35	2,4E+06	38,242	175,879	14,000
8	35	1,2E+06	31,182	187,364	10,970
15	35	7,5E+05	37,455	197,333	18,485
30	35	5,2E+05	43,182	189,045	13,121
45	35	5,0E+05	68,848	180,061	12,061
60	35	4,1E+05	31,545	210,939	16,045
90	35	4,4E+05	40,841	212,568	6,841

Tabla 34c.- Evolución del contenido en metales pesados del suelo adicionado según el Tratamiento D

Tpo muestreo días	Tª	Be (ppb)	Sc (ppb)	V (ppb)	Cr (ppb)	Mn (ppb)	Co (ppb)	Ni (ppb)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	As (ppb)	Y (ppb)	Mo (ppb)	Cd (ppb)	In (ppb)	Sn (ppb)	Sb (ppb)	Ba (ppb)	Tl (ppb)	Pb (ppb)	Bi (ppb)	Th (ppb)	U (ppb)
SUELO INICIAL				36	34,5	361,7	9,9	21,4	47,9	45,6	6,3			0,2				144,3	61,9				
4	21	0,018	5,668	85,348	166,338	6053,18	54,628	349,048	4631,3	175,646	24,654	59,448	2,388	7,47	0,008	134,738	12,088	3405,758	0,088	1106,894	2,114	1,98	0,798
8	21	0,018	5,898	89,408	179,818	4695,34	37,918	342,418	4707,41	179,406	25,994	61,568	2,148	5,14	0,008	20,128	11,698	3501,818	0,078	1444,444	2,064	1,97	0,578
15	21	0,008	5,938	88,628	180,258	5025,01	42,158	333,918	4498,08	171,336	23,574	59,428	2,088	6,6	0,008	14,628	12,548	3366,038	0,088	1111,844	2,074	1,9	0,618
30	21	ND	6,048	88,558	178,718	4420,08	34,898	313,418	4303,59	154,216	22,664	55,988	1,888	5,05	0,008	10,838	11,278	3336,398	0,108	1102,004	2,094	1,8	0,618
45	21	0,008	6,358	92,278	187,318	4178,94	32,858	305,218	4142,59	131,016	22,954	54,828	2,008	9,98	0,008	37,488	11,848	3344,628	0,088	1098,144	2,034	1,72	0,378
60	21	ND	7,118	100,168	207,078	3310,75	28,378	289,988	4117,39	109,176	24,004	53,718	1,828	18,3	0,008	13,748	12,578	3319,188	0,098	1095,784	1,864	1,81	0,528
90	21	ND	7,528	108,728	227,408	2990,24	25,498	278,968	4006,73	101,866	22,784	49,958	1,958	6,41	0,008	54,588	12,768	3320,538	0,088	1030,264	1,714	1,61	0,468
4	35	ND	5,368	83,688	163,118	5234,01	43,118	323,888	4414,74	150,046	24,554	57,858	2,088	5,65	0,018	16,918	11,908	3349,158	0,068	1108,944	1,984	1,95	0,618
8	35	0,008	5,398	85,388	168,838	3537,5	30,718	296,578	4255,8	290,566	24,174	55,958	1,848	6,87	ND	44,208	12,108	3346,808	0,078	1126,184	1,944	1,93	0,588
15	35	0,018	5,858	87,518	174,518	4126,77	33,738	291,698	4232,83	165,466	23,824	53,448	1,968	5,51	0,008	14,418	11,308	3308,678	0,068	1127,914	1,894	1,82	0,618
30	35	0,028	5,968	90,958	181,128	4100,75	32,948	272,628	4076,87	174,036	24,384	51,308	2,058	5,84	0,008	39,078	12,068	3294,368	0,068	1129,824	1,884	1,82	0,608
45	35	ND	6,358	94,098	187,338	4046,35	30,918	268,238	3872,21	130,396	23,424	48,928	2,108	5,02	0,008	42,238	12,748	3268,988	0,068	1091,374	1,844	1,69	0,368
60	35	0,018	6,458	95,108	193,388	3385,33	28,538	261,508	3907,92	130,156	23,304	48,688	1,998	4,85	0,008	4,718	12,898	3237,918	0,078	1123,324	1,914	1,72	0,518
90	35	0,008	7,378	108,188	223,038	3333,34	29,428	259,818	3729,42	87,906	23,384	44,738	1,848	5,73	0,008	14,078	12,838	3207,698	0,048	1052,254	1,734	1,6	0,468

ATCT
GCTGAT
CGGATC
TACGAT
TGATCAA
TTCGAC

Conculsiones

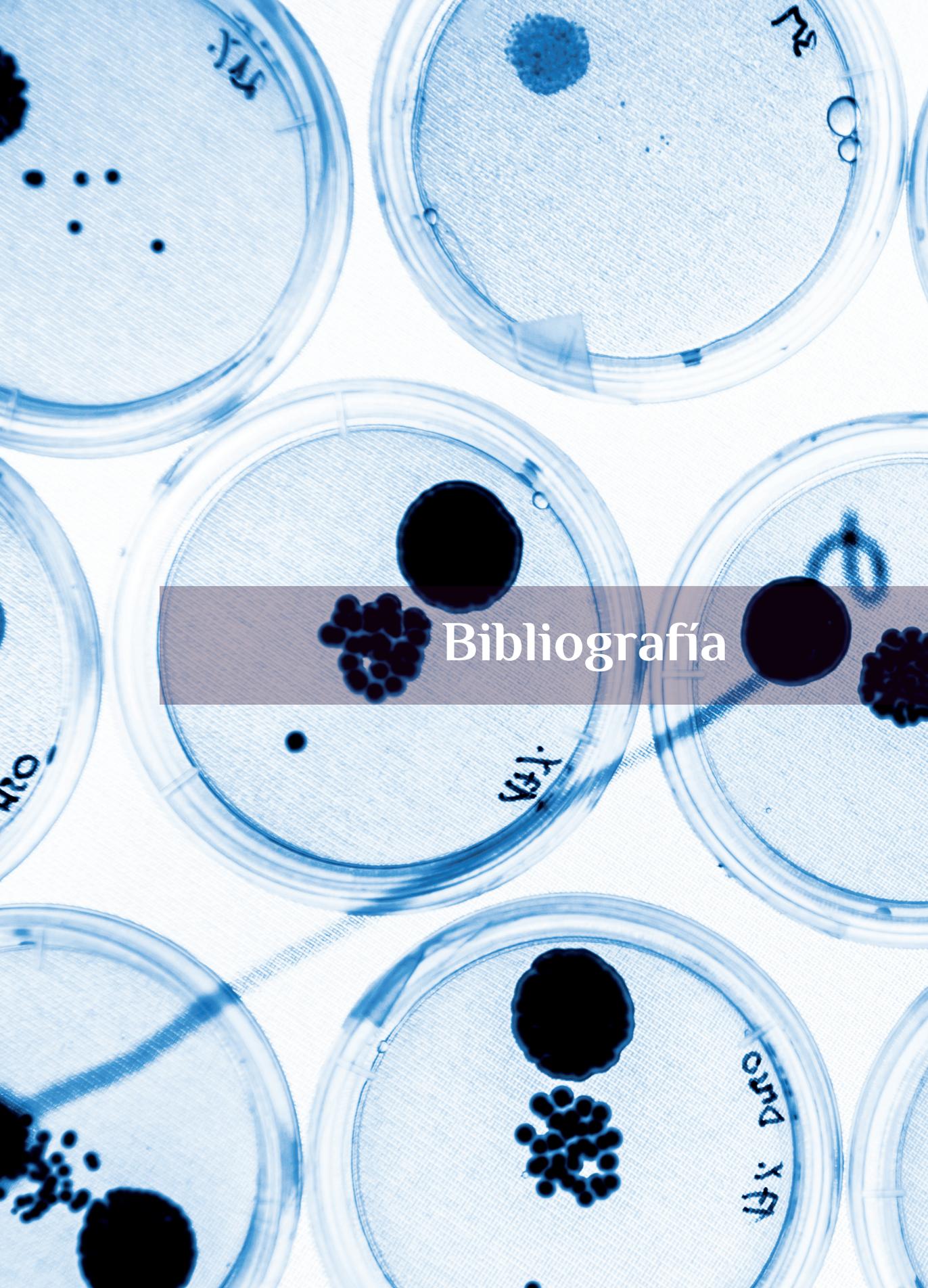
1. El tiempo óptimo del procesado para la elaboración del té de compost de lodos de depuradora se ha establecido en 5 días y en base a que el sistema alcanzo la estabilidad.
2. La adición de melaza a la concentración de 0,001% durante la producción del té de compost, como fuente extra de carbono y nutrientes, genera la acidificación del medio como consecuencia de los productos de hidrólisis formados durante el proceso de maduración lo que provoca alteraciones en la microbiota.
3. Las cepas bacterianas, aisladas e identificadas en el té de compost de lodos de depuradora como: *Rhodococcus sp.*, *Virgibacillus sp.*, *Leifsonia shinshuensis*, *Achromobacter xylooxidans*, *Cupriavidus sp.*, *Achromobacter sp.* y *Oceanobacillus sp.*, se mostraron altamente resistentes a la presencia de altas concentraciones de Pb, Cd, Cu y Zn en nuestras condiciones de cultivo, destacando especialmente *Rhodococcus sp.*, la cual mostró buen crecimiento en las máximas concentraciones ensayadas de todos los metales pesados.
4. Los estudios de microscopia electronica han puesto de manifiesto que la cepa *Rhodococcus sp.* acumula tanto en la superficie celular como intracelularmente, Cu, Zn, Cd y Pb, lo que sugiere procesos de biosorción y bioacumulación activa de estos metales pesados.

5. La adición de té de compost a un suelo agrícola de olivar, ensayada mediante experimentos en microcosmos edáficos, afecta significativamente al sistema edáfico, tanto en sus propiedades químicas y fisicoquímicas, incluyendo la biodisponibilidad de metales pesados, como en la actividad y diversidad microbiana del suelo. No obstante, los efectos de la adición de té de compost sobre dichas propiedades del suelo no son proporcionales a las cantidades de té añadidas. Se demuestra por tanto, que el patrón de riego, continuo o intermitente, tiene un efecto significativo que debe ser considerado en su empleo como biofertilizante.

6. Desde un punto de vista agronómico, y teniendo siempre como referencia los datos obtenidos del “tratamiento control”, las adiciones de té de compost al suelo incrementan el C.O. en las etapas iniciales, aunque a medio y largo plazo la escasa cantidad que contiene no supone un aumento significativo de la materia orgánica. En cuanto a los macronutrientes NPK, se ven aumentos globales de dichos nutrientes pero muy condicionados por el tipo de tratamiento. Así, es importante destacar el aumento del N ya que se trata de N total, y no de la fracción asimilable. Un aumento del N total nos llevaría a emitir la hipótesis de que alguno de los microorganismos presentes en el té de compost, tiene un comportamiento como fijador no simbiote de N, lo que debería ser objeto de futura investigación, debido al interés agronómico de este hecho. Así, una adición inicial de té resultó, en la mayoría de los casos más beneficiosa. Igualmente, se demuestra el efecto de las adiciones de té de compost en otras propiedades importantes del sistema edáfico. De esta manera, se aprecia un aumento, aunque moderado, de la C.E., incluso en las adiciones máximas.

7. La adición de té de compost al sistema edáfico, supone un aumento absoluto en el número de microorganismos aerobios mesófilos del suelo, aunque en comparación con el “tratamiento control” no es microbiológicamente significativo. Atendiendo a las actividades enzimáticas fosfatasa ácida, fosfatasa básica y arilsulfatasa, queda demostrado que la fosfatasa ácida se ve más afectada por la cantidad de té añadido, la fosfatasa por los días de incubación transcurridos y la arilsulfatasa por la temperatura. Finalmente se observa como las poblaciones de arqueas oxidadoras de amonio son las más influidas por la cantidad y pauta de riego con té de compost.

8. La adición de té de compost al suelo supone un aumento en las cantidades de metales pesados asimilables, aunque no significativas, incluso en los casos en los que se utiliza más té para el riego, lo que se debe a las pequeñas cantidades que contiene de esos metales. Este hecho provoca que los metales pesados no supongan un factor limitante para su aplicación como biofertilizante. No obstante, el comportamiento de los metales pesados durante la incubación de los microcosmos nos diferencia al Sc, V, Cr, Ab, Ba y As, que ascienden y al Mn, Co, Ni, Au, As, Zn, Y, Bi y U, que disminuyen. Se podría emitir la hipótesis no comprobada de que existen microorganismos en el suelo que retiran a estos últimos metales.



Bibliografía

- Adriano, D.C.**, (2001). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer Science & Business Media. Pp. 867.
- Ahluwalia, S., Goyal, D.**, (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98, 2243–2257.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F.**, (2000). Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresource Technology*. 75 (1), 43–48.
- Alef, K., Nannipieri, R., Trazar-Cepeda, C.**, (1995). Enzyme Activities. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Pp. 311-373.
- Areal, F.J., Riesgo, L.**, (2013). Farmers' views on the future of olive farming in Andalusia, Spain. *Land Use Policy*, 36, 543–553.
- Avidano, L., Gamalero, E., Cosa, G.P., Carraro, E.**, (2005). Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Applied Soil Ecology*. 30, 21–33.
- Barber, W. P. F.**, (2012). Influence of changing drivers on realising the value of sewage sludge as a resource. *Water Practice & Technology*. 7.
- Barrena, R., Font, X., Gabarrel, X., Sánchez, A.**, (2014). Home composting versus industrial composting: Influence of composting system on compost quality with focus on compost stability. *Waste Management*. 34, 1109-1116.
- Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S., Glick, B.R.**, (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry*. 37, 241–250.

- Bernal-Calderón, M.P., Gondar-Bouzada D.M.** (2008). Producción y gestión de los residuos orgánicos: situación actual a nivel mundial, comunitario y estatal. En: Moreno-Casco and Moral Herrero, 2008. Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Birkeland, P.W.**, (1999). Soils and geomorphology. Oxford University Press, NY. Pp. 430.
- BOJA** (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía) (2011) Ley 5/2011, de 6 de octubre, del olivar de Andalucía. 205, 6–13.
- Bouat, A., Crouzet, H.**, (1965). Notes techniques sur un appareil semi-automatique de dosage de l'azote (et de certains composés volatils). Annales agronomiques. 16.
- Bronik, C.J., Lal, R.**, (2005). Manuring and rotation effects on soil organic carbon concentration for different aggregate size fractions on two soils in northeastern Ohio, USA. Soil & Tillage Research. 81, 239–252.
- Bueno, B.Y.M., Torem, M.L., de Carvalho, R.J., Pino, G.A.H., de Mesquita, L.M.S.**, (2011). Fundamental aspects of biosorption of lead (II) ions onto a *Rhodococcus opacus* strain for environmental applications. Minerals Engineering, 24, 1619–1624.
- Bueno-Márquez, P., Díaz-Blanco, M.J., Cabrera-Capitán, F.**, (2008). Factores que afectan al proceso de compostaje. En: Moreno-Casco and Moral-Herrero, 2008. Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Caracciolo, A. B., Bottoni, P., Grenni, P.**, (2013). Microcosm studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems. Microchemical Journal. 107, 126–130.
- Cerda, A.**, (2007). La erosión y la degradación de los suelos en la comunidad valenciana. Actas curso erosión y degradación del suelo agrícola en España. CEMACAN Font Roja. Alcoy.

- Chesworth, W.**, (2008). Encyclopedia of soil science. Springer, The Netherlands. Pp. 902.
- Cordovil, C.M., Coutinho, J., Goss, M., Cabral, F.**, (2005). Potentially mineralizable nitrogen from organic materials applied to a sandy soil: fitting the one-pool exponential model. *Soil Use and Management*. 21, 65-72.
- Council Directive 91/271/EEC** of 21 May 1991 concerning urban wastewater treatment.
- Crecchio, C., Curci, M., Pizzigallo, M.D.R., Ricciuti, P., Ruggiero, P.**, (2004). Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biology and Biochemistry*. 36 (10), 1595–1605.
- Criquet, S., Braud, A.**, (2008). Effects of organic and mineral amendments on available P and phosphatase activities in a degraded Mediterranean soil under short-term incubation experiment. *Soil & Tillage Research*. 98, 164-174.
- Cronin, M.J., Yohalem, I.D.S., Harris, R.F., Andrews, J.H.** (1996). Putative mechanism and dynamics of inhibition of the: apple scab pathogen *venturia inaequalis* by compost extracts. *Soil Biology and Biochemistry*. 28 (9), 1241-1249.
- Çolak, F., Atarb, N., Yazıcıoğlu, D., Olgunb, A.**, (2011). Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. *Chemical Engineering Journal*, 173, 422–428.
- de Carvalho, C.**, (2012). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. *Research in Microbiology*. 163, 125-136.
- de Graaff, J., Duran, V.H., Jones, N., Fleskens, L.**, (2008). Olive production systems on loping land: Prospects and scenarios. *Journal of Environmental Management*, 89, 129–139.

- Diacono, M., Montemurro, F.,** (2009). Long-term effects of organic amendments on soil fertility. *Agronomy for Sustainable Development*. 30, 401-422.
- Dick, W.A., Cheng, L., Wang, P.,** (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil. Biol. Biochem.* 32, 1915-1919.
- Duarte, F., Jones, N., Fleskens, L.,** (2007). Traditional olive orchards on sloping land: Sustainability or abandonment?. *Journal of Environmental Management*, 89, 86–98.
- Fleck, L.C., Correa, F., Zachia, M.A.,** (2000). Physiological aspects of hydrocarbon emulsification, metal resistance and DNA profile of biodegrading bacteria isolated from oil polluted sites. *Biotechnology Letters*. 22, 285–289.
- Fomina, M., Gadd, G.M.,** (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, 160, 3–14.
- Francis, C.A., Beman, J.M., Kuypers, M.** (2005). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*. 1, 19-27.
- Fytili, D., Zabaniotou, A.,** (2008). Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 12, 116-140.
- Gandolfi, I., Siculo, M., Franzetti, A., Fontanarosa, E., Santagostino, A., Bestetti, G.,** (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresource Technology*. 101, 568-575.
- García-Izquierdo, C.,** (2011). Fertilización orgánica con composts y té de compost: su aplicación al suelo. Canarias.

- Gisset, T., Botero, A.E., de Mesquita, L.M., Torem, M.L.** (2007). Biosorptive removal of Cd and Zn from liquid streams with a *Rhodococcus opacus* strain. *Minerals Engineering*, 20, 939–944.
- Gómez, J.A.**, (2007). Erosión en el olivar andaluz. *Actas de Curso erosión y degradación del suelo agrícola en España*. CEMACAN Font Roja. Alcoy.
- Gómez, J.A., Giraldez, J.V., Fereres E.**, (2007b). Cover crop effects on soil conservation in olive orchards. *Actas de European Geophysical Union*. Viena.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A.**, (1997). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*. 64, 7-15.
- Hong, J., Hong, J., Otaki, M., Jolliet, O.**, (2009). Environmental and economic life cycle assessment for sewage sludge treatment processes in Japan. *Waste Management*. 29, 696-703.
- Insam, H., de Bertoldi, M.**, (2007). Microbiology of the composting process. *Waste Management Series*. 8, 25-48.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J.**, (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 403–405.
- Johansson, K., Perzon, M., Fröling, M., Mossakowska, A., Svanström, M.**, (2008). Sewage sludge handling with phosphorus utilization e life cycle assessment of four alternatives. 16, 135-151.
- Karakagh, R.M., Chorom, M., Motamedi, H., Kalkhajeh, Y.K., Oustan, S.**, (2012). Biosorption of Cd and Ni by inactivated bacteria isolated from agricultural soil treated with sewage sludge. *Ecology & Hydrobiology*. 12 (3), 191-198.
- Keeling, A., Paton, I.K., Mullett, J.**, (1993). Germination and growth of plants in media containing unstable refuse-derived compost. *Boil Biology and Biochesmistry*. 26 (6), 767-772.

- Kelly, J.J., Haggblom, M., Tate, R.L.,** (1999). Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry*. 31 (10), 1455-1465.
- Khiari, B., Marias, F., Zagrouba, F., Vaxelaire, J.,** (2004). Analytical study of the pyrolysis process in a wastewater treatment pilot station. *Desalination*. 167, 39-47.
- Knight, B.P., Mcgrath, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E.,** (1997). Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. *Applied Environmental Microbiology*. 63, 39-43.
- Koné S., Dionne, A., Tweddell, R.J., Antoun H., Avis, T.J.,** (2010). Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control*. 52, 167-173.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M., Woldendorp J.W.,** (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (4), 1489-1497.
- Kizilkaya, R., Bayrakh, B.,** (2005). Effects of n-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *Applied Soil Ecology*. 30 (3), 192-202.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M.,** (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics Applications Note*, 17. 1244-1245.
- Larkin, R.P.,** (2008). Relative effects of biological amendments and crop rotations on soil microbial communities and soilborne diseases of potato. *Soil Biology & Biochemistry*. 40, 1341-1351.

- Lisk, J.D.**, (1989). Compressive Strength of Cement Containing Ash from Municipal Refuse or Sewage Sludge Incinerators. *Environmental Contamination and Toxicology*. 42, 540-543.
- López-Piñero, A., Murillo, S., Barreto, C., Muñoz, A., Rato, J.M. Albarrán, A., García, A.** (2007). Changes in organic matter and residual effect of amendment with two-phase olive-mill waste on degraded agricultural soils. *Science of the Total Environment*. 378, 84–89.
- Malerius, O., Werther, J.**, (2003). Modeling the adsorption of mercury in the flue gas of sewage sludge incineration. *Chemical Engineering Journal*. 96, 197–205.
- Malik, A., Jaiswal, R.**, (2000). Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 177–182.
- Martín-Riegel P.** (2012). Té de compost, Una nueva herramienta para revitalizar el potencial biológico del suelo. Valencia.
- Mehta, C.M., Palni, U., Franke-White, I., Sharma, A.K.**, (2014). Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*. 34, 607-622.
- Miao-miao, H., Guang-ming, T., Xin-qiang L.**, (2009). Phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead during the aerobic composting of sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 671–677.
- Milgroom, J., Soriano, M.A., Garrido, J.M., Gómez, J.A., Fereres, E.**, (2005). The influence of a shift from conventional to organic olive farming on soil management and erosion risk in southern Spain. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 22, 1–10.
- Miyatake, F., Iwabuchi, K.**, (2006). Effect of compost temperature on oxygen uptake rate, specific growth rate and enzymatic activity of microorganisms in dairy cattle manure. *Bioresource Technology*. 97, 961–965.

- Morgan, R.P.C.**, (1995). Soil erosion and conservation. Longman Group Limited. London.
- Muñoz, A.J., Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Larini, K., Espínola, F.**, (2012). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal*, 210, 325–332.
- Muyzer, G., De Waal, E., Uitterlinden A.G.**, (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (3). 695-700.
- Naidu, Y., Meon, S., Siddiqui., Y.**, (2013). Foliar application of microbial-enriched compost tea enhances growth, yield and quality of muskmelon (*Cucumis melo L.*) cultivated under fertigation system. *Scientia Horticulturae*. 159, 33-40.
- Navarro, G.**, (2003). Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. Pp. 487.
- Nghiem, L.D., Nguyen, T.T., Manassa, P., Fitzgerald, S.K., Dawson, M., Vierboom S.**, (2014). Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 95, 160-166.
- Pant, A.P., Radovich, T.J.K., Hue, N.V., Paull, R.E.**, (2012). Biochemical properties of compost tea associated with compost quality and effects on pak choi growth. *Scientia Horticulturae*. 148, 138-146.
- Paradelo, M., Devesa, R., Moldes, A.B., Barral, M.T.**, (2007). Physiologically based extraction of heavy metals in compost: Preliminary results. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 83–85.

- Parr, J.F., Epstein, E., Willson, G.B.** (1978). Composting sewage sludge for land application. *Agriculture and Environment*. 4, 123-137.
- Pérez-Lomas, A.L., Delgado, G., Párraga, J., Delgado, R., Almendros, G., Aranda, V.** (2010). Evolution of organic matter fractions after application of co-compost of sewage sludge with pruning waste to four Mediterranean agricultural soils. A soil microcosm experiment. *Waste Management*. 30, 1957-1965.
- Perucci, P.** (1990). Effect of the addition of municipal solid-waste compost on microbial biomass and enzyme activities in soil. *Biology and Fertility of Soils* December. 10 (3), 221-226.
- Porta, J.** (1994). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Tabatabai, M.A., Bremer, J.M.** (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1, 301-307.
- Tabatabai, M.A., Bremer, J.M.** (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Proceedings*. 34, 225-229.
- Tejada, M., Hernández, M.T., García, C.** (2009). Soil restoration using composted plant residues: Effects on soil properties. *Soil & Tillage Research*. 102, 109-117.
- Theodoratos, P., Moirou, A., Xenidis, A., Paspaliaris, I.** (2000). The use of municipal sewage sludge for the stabilization of soil contaminated by mining activities. *Journal of Hazardous Materials*, B77, 177-191.
- Rivero, C., Hernández, E.** (2001). Efecto de la aplicación de dos tipos de compost en la evolución de CO₂ y la actividad de fosfatasa en un suelo inceptisol. *Venesuelos*. 9, 24-32.
- Rundong L., Jing Y., Weiyun W., Yanlong L., Ziheng Z.** (2014). Transformation of phosphorus during drying and roasting of sewage sludge. *Waste Management*. 34, 1211-1216.

- Sabate, J., Vinas, M., Solanas, A.M.,** (2006). Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere*. 63, 1648–1659.
- Sakurai, M., Wasaki, J., Tomizawa, Y., Shinano, T., Osaki, M.,** (2008). Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Science and Plant Nutrition*. 54, 62-71.
- Sánchez-Monedero, M.A., Mondini, C., Nobili, M., Leita, L., Roig, A.,** (2004). Land application of biosolid. Soil response to different stabilization degree of the threatened organic matter. *Waste Management*. 24 (4), 325-335.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, F.L., Castberg, T., Hahn, D.,** (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology*. 30, 237-251.
- Scheuerell, S., Mahaffee, W.,** (2002). Compost tea: Principles and Prospects for Plant Disease Control. *Compost Science & Utilization*. 10 (4), 313-318.
- Schroeder, D.,** (1984). Soils-facts and compost. Potash Institute, Bern. Switzerland. Pp. 140.
- Serramiá, N., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Contin, M., de Nobili, M.,** (2013). Changes in soil humic pools after soil application of two-phase olive mill waste compost. *Geoderma*, 192, 21–30.
- Shrestha, K., Shrestha, P., Walsh, K.B., Harrower, K.M., Midmore, D.J.,** (2011). Microbial enhancement of compost extracts based on cattle rumen content compost – Characterisation of a system. *Bioresource Technology*. 102, 8027-8034.
- Shulze, K.L.** (1961). Continuous Thermophilic Composting. Michigan.

- Sorkhoh, N.A., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Stretton, R.J., Radwan, S.S.,** (1990). Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environmental Pollution*. 65, 1-17.
- St. Martin, C.C.G., Brathwaite, R.A.I.,** (2012). Compost and compost tea: Principles and prospects as substrates and soilborne disease management strategies in soil-less vegetable production. *Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems*. 28 (1), 1-33.
- Sunderg, G., Smars, S., Jönsson, H.,** (2004). Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresource Technology*. 95, 145–150.
- Van der Geize, R., Dijkhuizen, L.,** (2004). Harnessing the catabolic diversity of *Rhodococci* for environmental and biotechnological applications. *Ecology and industrial microbiology*. 7, 255–261.
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y.,** (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26, 266–291.
- Vílchez, R., Pozo, C., Gómez, M.A., Rodelas, B., González-López, J.,** (2008). Dominance of sphingomonads in a copperexposed biofilm community for groundwater treatment. *Microbiology*. 153, 325–337.
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Werner, D.,** (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the canary islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2096–2104.

- Viti, C., Minia, A., Ranallib, G., Lustrato, G., Giovannettia, L.,** (2007). Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, Article in Press, Corrected Proof.
- Vullo, D.L., Ceretti, H.M., Daniel, M.A., Ramírez, S.A.M., Zalts, A.,** (2008). Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresource Technology*, 99, 5574–5581.
- Wang, J., Chen, C.,** (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27, 195–226.



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tesis Doctoral

MARÍA VELA CANO

Granada, noviembre de 2014

