



ALTERNATIVAS METODOLÓGICAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA CALIDAD DE UN COMPOST MEDIANTE TÉCNICAS ANALÍTICAS MULTIRESPUESTA

Petruta Mihaela Matei^(1,2), Pablo Martín-Ramos^(1,3), Iosody Silva Castro⁽¹⁾, Jesús Martín-Gil⁽¹⁾, Salvador Hernández-Navarro⁽¹⁾, Mercedes Sánchez-Báscones⁽¹⁾, Marian Stoian⁽²⁾

⁽¹⁾E.T.S.I.I.A.A. y LTI Universidad de Valladolid, Av. Madrid, 44, Palencia, 34004, España

⁽²⁾Universidad de Ciencias Agronómicas, B-dul Marasti, 59, Bucarest, Rumania

⁽³⁾Universidad de Zaragoza, C. Pedro Cerbuna, 12, 50009, Zaragoza, Aragón, España
petruta_99@yahoo.com

Resumen

El compostaje es la técnica de estabilización controlada de los residuos orgánicos y su optimización garantiza la máxima calidad del producto final. Se ofrecen casos prácticos sobre el control de diferentes tratamientos biológicos o ensayos de compostabilidad de residuos orgánicos tanto en pila abierta, como en un biodigestor cerrado discontinuo mediante técnicas de análisis disponibles en el LTI de la Universidad de Valladolid.

Se presenta en principio diversos casos prácticos para el seguimiento y control de la calidad de un compost determinado (gallinaza/sarmientos de la vid) y se ofrecen modelos para determinar la mezcla más idónea para formar la pila de compostaje. Seguidamente se presentan métodos físico-químicos y espectroscópicos para el estudio de los parámetros del proceso de compostaje: la relación C/N, la humedad, el aire y la temperatura, el análisis del color, C orgánico soluble, pH y CE, así como el índice de germinación (IG%). Sobre las muestras secas y tamizadas de compost se determinan los parámetros a lo largo del proceso de compostaje y en la fase de maduración: contenido de C, H, N y O, el grado de mineralización mediante los índices de policondensación y aromaticidad y los COVs, HAPs, ácidos orgánicos húmicos y fúlvicos y el grado de polimerización y aromaticidad de las especies químicas presentes.

Para cada parámetro objeto de análisis se propone la mejor tecnología disponible. Por ejemplo el análisis mediante equipos LECO CHN para determinar el contenido de C, H y N y las relaciones entre ellos y los equipos de espectrometría FTIR/Raman, UV-VIS para el seguimiento del grado de madurez de un compost.

El control de los procesos cinéticos y termodinámicos mediante análisis térmico (TG-ATD-DSC), masas, CG, HPLC y, FRX, DRX, RMN. También se presentan en las fichas de prácticas la bibliografía específica y normativa vigente, control de calidad (ASTM), y especificaciones necesarias.

Práctica 1

Título: Determinación de las proporciones adecuadas para conseguir un compostaje eficaz a partir de la relación Carbono/ Nitrógeno y de la Humedad

Objetivo

Determinar para 100 kg de mezcla (sarmientos/gallinaza), las proporciones ideales que se deben usar de gallinaza y de sarmientos de la vid para formar una pila de



compostaje y para rellenar un biodigestor cerrado discontinuo y obtener al final un compost estable y maduro conociendo previamente las relaciones C/N y la humedad de los sustratos.

Fundamento

La humedad óptima para el crecimiento microbiano decrece cuando está por debajo del 30% y se mantiene óptima entre el 50-70 %. El exceso de humedad se corrige con aireación y el defecto mediante el riego con agua. En el proceso de mineralización se producen reacciones de degradación resultando moléculas como CO₂, H₂O, NH₃ etc., y liberándose macro y micronutrientes en formas asimilables para las plantas. Poincelot, 1975, recomienda para la determinación del grado de madurez de un compost y el final del proceso de compostaje, el uso de la relación C/N próximo a 30, aunque varía dependiendo de los diferentes métodos que se utilicen para la determinación del carbono como del nitrógeno, por lo que su uso ha de realizarse con reservas. Los microorganismos se alimentan de materia orgánica que descomponen y sus tejidos presentan una relación de 30 parte de carbono por 1 de nitrógeno [1]. Durante el compostaje el contenido en nitrógeno no varía significativamente, sin embargo, el carbono se pierde hasta más de las 2/3 partes, por lo que la relación C/N disminuye durante el proceso. La relación C/N para el humus en el suelo alcanza un valor final próximo a 10.

Material y Métodos

Balanza de precisión de 4 cifras decimales.

Estufa de secado

Equipo LECO CHN 2000

Los contenidos de materia seca y de humedad y densidad aparente se determinan en una estufa a 100°C por el método UNE-EN 13040.

Medición de los contenidos de C y N con un analizador LECO CHN 2000. Se precisa 200 mg de muestra (3 repeticiones) de residuos de poda y de gallinaza, por separado.

Fundamento del LECO CHN 2000: combustión directa en una cámara a 900° C y detección mediante sensor IR de los contenidos de Carbono e Hidrógeno y el Nitrógeno mediante una célula de termoconductividad diferencial (TCD).

Procedimiento y Resultados

Para conocer las proporciones adecuadas para conseguir un compostaje eficaz, se precisa primero conocer los contenidos de humedad y sobre la muestra seca determinar los contenidos de C y N y la relación C/N de cada sustrato por separado, en nuestro caso gallinaza (A) y sarmientos (B) [2]. Para 100 kg de material de residuos a compostar, se puede predecir las proporciones de gallinaza (A) y de sarmientos de la vid (B) que se deben mezclar inicialmente, utilizando la ecuación [1] y teniendo en cuenta que A+B es 100 kg y determinar el ratio final A/B. Efectuar los cálculos para diferentes supuestos o (C/N)_{mezcla} : (i) (C/N)_{mezcla} 25 y (ii) (C/N)_{mezcla} 30 y en principio sin considerar la humedad de la mezcla (ecuación [1] y Tabla 1)

$$A (C/N)_A + B (C/N)_B = 100 (C/N)_{mezcla} \quad [1]$$

Tabla 1. Determinación de la relación más idónea (en peso, seco) entre gallinaza (A) y sarmientos (B) para llevar a cabo el proceso de compostaje y para dos supuestos o (C/N)_{mezcla} 25 y 30 y A+B=100Kg, predecir el ratio A/B

Sustrato	Humedad (%)	C (%)	N (%)	(C/N)	Kg de sustrato para (C/N) _{mezcla} 25	Kg de sustrato para (C/N) _{mezcla} 30
----------	-------------	-------	-------	-------	--	--



Gallinaza (A)						
Sarmientos (B)						
Relación (A/B)						

A = masa de gallinaza inicial o peso seco; B= masa de sarmientos de la vid o peso seco; C (%) = % Carbono; N (%)=% Nitrógeno.

Discusión de resultados

1. Justificar adecuadamente la precisión de los resultados anteriores para conseguir una buena mineralización en relación con los intervalos óptimos propuestos en la literatura y los valores de referencia (C/N) para cada sustrato.
2. A partir del ratio Kg de gallinaza (A)/Kg de sarmientos (B), precisar ¿cuántas capas sería necesario hacer para formar una pila abierta o un biodigestor cerrado discontinuo de una carga de 100 Kg y mantener su humedad?

Referencias:

- [1] Bhoiyard, R.V., Olaniya, M.S. y Bhide, A.D. (1979). Effect of temperature on mineralization of nitrogen during aerobic composting. Indian J. Environ. Hith. 21 (1), 23-24.
- [2] Matei, P.M., Sánchez Báscones, M., Martín-Villullas, M.T., Díez-Gutiérrez, M.A., García-González, M.C. (2014). Eficiencia del compostaje de sarmientos de vid mediante pilas abiertas como método de higienización. IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 156-160.
- [3] Poincelot, R. P. (1975) The biochemistry and methodology of composting. Conn. Agri. Expt. Sta. Bull n°745.

Práctica 2

Título: Determinar el grado de mineralización de un compost

Objetivo

Determinar el grado de mineralización de un compost (sarmiento/gallinaza 2:1) a partir del seguimiento de la relación C/N y H/C (analizador LECO CHN 2000) y con diferentes tiempos de incubación (0, 20, 40, y 60 días).

Fundamento

La mineralización del nitrógeno orgánico es un parámetro útil para determinar fácilmente los compuestos de nitrógeno biodegradables y por consiguiente se puede correlacionar inversamente con la estabilidad de un compost. El grado de mineralización de la materia orgánica depende sobre todo de la naturaleza de los sustratos. Los materiales poco descompuestos como cortezas de pino o materiales de la poda de la vid, producen una disminución de la cantidad de nitrógeno soluble. A medida que la relación C/N es más baja o inferior a 20, más mineralizado se encuentra un compost [2,3]. El ratio H/C mide el contenido de estructuras aromáticas y grupos carboxílicos presentes en un compost y cuanto mayor es este índice mayor es la cantidad de ácidos húmicos



presentes y menor la cantidad de ácidos fúlvicos y por consiguiente mejora la madurez de un compost ya que aumenta el grado de polimerización de la materia orgánica [1].

Material y Métodos

Balanza de precisión de 4 cifras decimales.

Estufa de secado

Horno de mufla

Molino ultracentrífugo

Electrodos de PH y de CE

Sensor de temperatura

Equipo LECO CHN 2000

Los contenidos de materia seca y de humedad y densidad aparente se determinan en una estufa a 100°C por el método UNE-EN 13040.

La relación C/N y H/C, se puede llevar a cabo en un analizador LECO CHN 2000. Se precisa 200 mg de muestra (3 repeticiones). Para la determinación del carbono orgánico total se puede usar el método de Dumas-LECO (combustión seca a 950 °C utilizando oxígeno de alta pureza 99,9%). El producto de la combustión, CO₂ y H₂O es filtrado, secado y cuantificado por medio de una celda de radiación infrarroja. El Nitrógeno mediante una célula de termoconductividad diferencial (TCD). Para la calibración del equipo se utilizaron estándares suministrados por la empresa LECO.

El contenido de materia orgánica (MO) se puede llevar a cabo por calcinación de la muestra seca a 103°C y calcinación hasta 450°C tras evaluar la pérdida de masas y el contenido de cenizas como residuo de ignición (normativa UNE-EN 13039:2001).

Alternativamente al método LECO, se puede utilizar para la determinación del nitrógeno orgánico el método Kjeldahl y conocer el contenido en nitrógeno (NH₄⁺) mg/l y el contenido en nitrógeno total (NO₃⁻ +NH₄⁺) mg/l (normativa UNE-EN 13654-1:2002 y 13654-2:2002).

Una vez conocido el contenido de MO, y el contenido de nitrógeno (N-Kjeldahl) se puede determinar la relación (C/N) y comparar su resultado con el obtenido por el método LECO, aplicando la ecuación [1]:

$$C/N_{(Kjeldahl)} = MO / 1,724 \cdot N_{-Kjeldahl} \quad [1]$$

Procedimiento y Resultados

Se deben tomar muestras de los biodigestores en distintas fechas (0, 20, 40, 60 y 250 días) utilizando un émbolo cilíndrico o sonda desinfectada, y bolsas de plástico auto-sellada y determinar los contenidos de C/N e H/C. Para llevar a cabo las determinaciones de C/N y de H/C, previamente se debe determinar la humedad de las muestras sometidas a desecación en estufa ventilada a 100 °C, 48 horas y moler y tamizar las muestras hasta conseguir un diámetro de partícula de 0.08 mm, y determinar otros parámetros en la pila o biodigestor, para el seguimiento de la estabilidad del compost (Temperatura, CE, pH, etc).

En la Tabla 1, se deben indicar los resultados de los distintos parámetros para ofrecer los resultados y de acuerdo con la metodología.



Tabla 1. Determinación del grado de mineralización de muestras de compost media de tres determinaciones.

Días	T °C	Humedad (%)	MO (% s.m.s.)	pH	Conductividad (uS/cm)	N (NO ₃ ⁻ +NH ₄ ⁺) (mg/l)	N (NH ₄ ⁺) (mg/l)	C/N (Kjeldhal)	C/N (LECO)	H/C (LECO)
0										
5										
10										
20										
40										
60										

Discusión de resultados

1. A partir de los distintos cocientes C/N e H/C, determinados en función del tiempo y de la temperatura, de la humedad y el pH y de los intervalos que se proponen en la bibliografía para este tipo de sustratos, verificar el grado de mineralización/aromatización de la mezcla gallinaza/sarmientos 2:1 con el tiempo y la temperatura. Cuando se precise realizar un volteo o airear el biodigestor, comentar como afecta a la relación C/N y a la relación H/C.
2. Explicar el proceso de mineralización del compost durante el tiempo ensayado y verificar si la pila debería seguir en marcha transcurridos los dos primeros meses.

Referencias

- [1] Bertoldi, M. (2013). The Science of Composting. Springer Science & Business Media.
- [2] Rosen, C.J., Halbach, T.R., Swanson, B.T. (1993) Horticultural uses of municipal solid waste composts. HortTechnology, 3(2), 167-173.
- [3] Urbano Terrón, P. (2002) Fitotecnia: ingeniería de la producción vegetal. Mundi Prensa.

Práctica 3

Título: Determinación del contenido de extractos húmicos de un compost mediante espectrometría UV-Vis y ATR- FTIR

Objetivo:

Medir el grado de mineralización de la materia orgánica de un compost (gallinaza/sarmientos 2:1), mediante espectroscopía UV-Vis y ATR-FTIR.

Fundamento

Durante el proceso de compostaje varía la relación de ácidos húmicos (AH) a ácidos fúlvicos (AF) y se produce un incremento progresivo de AH y un descenso de AF y por consiguiente un incremento de la tasa de polimerización y el cociente AH/AF se puede utilizar como indicador del grado de madurez de un compost (humificación) [1]. La madurez de un compost se encuentra relacionada con la disminución del carbono soluble a lo largo del proceso y éste se puede relacionar con medidas de absorbancia a 465 nm [4]. En la bibliografía se encuentran numerosas referencias sobre espectros de absorción de extractos húmicos y la importancia del uso de las relaciones E2/E3 (UV) y E4/E6 (Vis) como indicadores de la madurez de un compost o de sustancias orgánicas mineralizadas [2,3,4] y de la identificación de lignina o sus productos de degradación. La espectroscopía



FTIR se viene utilizando para identificar las fracciones de ácidos fúlvicos (AF) y húmicos (AH) aislados de efluentes o lixiviados de los procesos de compostaje, mediante el estudio de las intensidades de las bandas a 1720 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} y 1220 cm^{-1} y de las relaciones $1720/1620$, $1720/1380$, $1720/1220$, $1380/1620$, $1380/1220$. La relación $1380/1620$ aumenta con el carácter aromático debido a la contribución de la banda a 1380 cm^{-1} , mientras que a 1620 cm^{-1} predomina la contribución del grupo carboxilato [5].

Material y métodos

Muestras de compost (de las diferentes etapas del proceso)
 Agua destilada desionizada
 Papel filtro
 Estufa de secado
 Molino ultracentrífugo
 Agitador magnético
 Centrífuga
 Espectrofotómetro UV-Vis
 Espectrometro ATR-FTIR
 LECO CHN

Procedimiento y Resultados

Las muestras procedentes de la pila o biodigestor (4 repeticiones) en los tiempos (0, 5, 10, 20, 40 y 60 días) se deben en primer lugar introducir en estufa a 100 °C durante 48 horas y luego deben ser molidas en un molino ultracentrífugo para homogeneizar el tamaño de partícula $<0.08\text{ mm}$. Los extractos acuosos se pueden preparar a partir de 2 gramos de cada muestra y diluir en 20 mL de agua desionizada y agitar durante 30 min y centrifugar durante 10 min a 2500 rpm y decantar el sobrenadante y filtrar en papel filtro. Con los liofilizados se pueden determinar los contenidos de Carbono (C soluble mg/l) en el equipo LECO CHN.

Para poder trabajar con el espectrofotómetro UV-Vis debemos diluir el concentrado en agua a una proporción 1:25, o superior según el grado de concentración y registrar el espectro y medir las absorbancias a 250, 365, 465 y 665 nm. Para poder operar con el equipo de ATR-FTIR se debe tomar una porción del sobrenadante inicial y sin diluir liofilizar la muestra para su estudio y comparar los registros con los espectros de las muestras en fase sólida extraídas directamente del biodigestor (0,1 gramos).

Para determinar la absorbancia de cada muestra se debe multiplicar esta por el factor de dilución* y tratar de obtener los ratios o índices de aromaticidad E2/E3 (250/365 nm) y de humificación E4/E6 (465/665 nm) y representarles frente al tiempo de compostaje (0, 5, 10, 20, 40, y 60 días) y también de la relación de intensidades (alturas) obtenidas de los espectros de FTIR y de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la espectrofotometría UV-Vis y FTIR para muestras de compost.

Compost	A^{285}	A^{250}	A^{365}	E2/E3 (UV)	A^{465}	A^{665}	E4/E6 (VIS)	1380 cm^{-1}	1620 cm^{-1}	$I_{1380\text{ cm}^{-1}}/I_{1620\text{ cm}^{-1}}$ (FTIR)
Muestra 1										
Muestra 2										
Muestra 3										
Muestra 4										



*Si la absorbancia sale del rango de 1.000 unidades aumentar la dilución

Discusión de resultados

1. Explicar la evolución de la curva E4/E6 en función del tiempo de compostaje, y determine el grado de madurez del compost (gallinaza/sarmientos 2:1) en las distintas fases del proceso de compostaje.
2. Estudiar el contenido de lignina mediante el estudio de la intensidad de la banda E1 (281nm).
3. Determinar y explicar las variaciones del carbono soluble (mg/L) y de la absorbancia a 465 nm a lo largo del tiempo de compostaje. Tratar de establecer una correlación lineal entre la Absorbancia a 465nm y Carbono soluble (C_{soluble} mg/l) para los extractos de las muestras seleccionadas.
4. Estudiar los espectros ATR-FTIR de los extractos liofilizados y de las muestras sólidas extraídas del biodigestor y la evolución de la madurez del compost con diferentes tiempos de compostaje (0, 5, 10, 20, 40, y 60 días) y a partir del estudio de la relación de intensidades (altura de picos) 1720/1620, 1720/1380, 1720/1220, 1380/1620, 1380/1220.

Referencias

- [1] Bertoldi, M. (2013) The Science of Composting. Springer Science & Business Media
- [2] Canet, R.y Pomares, F. (1995) Changes in Physical, Chemical and Physico-chemical Parameters during the Composting of Municipal Solid Wastes in Two Plants in Valencia. Bioresource Technology 51(2-3):259-264.
- [3] Chen Y & Inbar Y (1993) Chemical and spectroscopical analyses of organic matter transformations during composting in relation to compost maturity. In: Hoitink HAJ & Keener HM (Eds) Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects (pp 551–600). The Ohio State University.
- [4] Chefetz, B., Hader, Y., Chen Y (1998) Dissolved Organic Carbon Fractions Formed during Composting of Municipal Solid Waste: Properties and Significance. Clean Air Soil Water, 26(3), 172-179.
- [5] Izquierdo, M., Antelo, J. Fio, S., Gondar, D., Iglesias, A., López, R., Arce, F. (2004) Caracterización de ácidos fulvicos y húmicos extraídos de una turbera minerotrófica. Edafología 11 (3), 329-339.

Práctica 4

Título: Determinación del grado de fitotoxicidad y madurez del compost

Objetivo

Determinar el grado de fitotoxicidad y madurez de una muestra de compost mediante el valor del índice de germinación (IG%).

Fundamento

La determinación del grado de fitotoxicidad y de madurez del compost puede medirse respecto al porcentaje de germinación de semillas (IG%) en un extractor acuoso del compost [7], de acuerdo al siguiente criterio de interpretación: valores de IG igual o mayor



a 80% indicarían que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración; valores entre 50% y 80% indicarían una presencia moderada de estas sustancias y valores iguales o menores de 50% indicarían que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas. Los efectos fitotóxicos de un compost pueden atribuirse a: salinidad elevada [2], presencia de ácidos alifáticos de cadena corta [3], presencia de fenoles [1], presencia de metales pesados e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) [5] y emisiones de amonio [6]. En el seguimiento del proceso de compostaje el uso del índice de germinación (IG%) sirve para comprobar la presencia de ciertas sustancias (por ej. ácidos orgánicos de cadena corta) producidas durante la degradación y estabilización de la materia orgánica y que pueden reducir o inhibir la germinación de la semilla [4].

Material y Métodos

Determinar frente a un blanco (agua destilada) el poder germinativo de un compost mediante el test de Zucconi [7]). Para realizar este test hay que humedecer el material hasta alcanzar el 60% de humedad y dejar en reposo durante 30 minutos. Se diluye el extracto hasta el 10%, y se agita durante 30 minutos y se somete a filtración a vacío y se introduce en placas Petri (8,5 cm) sobre discos de papel de filtro esterilizado (Whatman Nº1) y sobre los que se deposita las semillas. Una vez que se moja el papel y las semillas con el extracto acuoso se efectúa la incubación de las semillas en la oscuridad a 25°C durante 72 horas. Para el control de la temperatura y la humedad de las placas, se puede utilizar el extracto acuoso y efectuar riegos periódicos si fuera necesario.

Procedimiento y Resultados

Para calcular el índice de germinación se cuantifica el número de semillas germinadas y su longitud (ecuación [1] y Tabla 1):

$$IG(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ semillas germinadas} \times \text{longitud de la raíz (tratadas)}}{n^{\circ} \text{ semillas germinadas} \times \text{longitud de la raíz (blanco)}} \times 100 \quad [1]$$

Tabla 1. Determinación del índice de germinación (IG%) utilizando un extracto acuoso de compost en dos diluciones D1 y D2, realizando 4 repeticiones por extracto (R1-R4).

Muestra	Longitud de raíz (mm) a los 3 días				Longitud media (mm)	Nº semillas germinadas	σ*	IG(%)
	R1	R2	R3	R4				
Blanco								
D1								
D2								

Blanco – agua destilada; σ* - desviaciones estándar.

Según el test de Zuconi [7], las diluciones de compost en agua utilizadas son las siguientes:

D1 = 5g compost + 100 ml agua destilada

D2 = 1,7g compost + 100 ml agua destilada.

La madurez del compost es el momento en el que el compost alcanza el grado de estabilidad y que permite su almacenamiento sin que ocurran descomposiciones.



Las semillas usadas pueden ser de las especies de la temporada en que se hacen los ensayos de germinación (*Lepidium sativum* L., *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L. etc.)

Discusión de resultados

1. Comparar el valor del índice de germinación (IG%) al principio del proceso de compostaje con el valor del final del proceso de compostaje.
2. Valorar el grado de estabilidad y madurez del compost cuando se emplea en combinación con turba como sustrato de cultivo.

Referencias:

- [1] Albuquerque, J. A., González, J., García, D., and Cegarra, J. (2006). Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo”, the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64, 470-477.
- [2] Aslam, D. N., Horwath, W., and Vander Gheynst, J. S. (2008). Comparison of several maturity indicators for estimating phytotoxicity in compost-amended soil. *Waste Management* 28, 2070-2076.
- [3] Chanyasak, V., Katayama, A., Hirai, M. F., Mori, S., and Kubota, H. (1983). Effects of compost maturity on growth of komatsuna (brassica rapa var. pervidis) in neubauer's pot: I. Comparison of Growth in Compost Treatments with That in Inorganic Nutrient Treatments as Controls. *Soil science and plant nutrition* 29, 239-250.
- [4] Liu, D., Zhang, R., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., Yu, G., Xu, Z., and Shen, Q. (2011a). Changes in biochemical and microbiological parameters during the period of rapid composting of dairy manure with rice chaff. *Bioresource Technology* 102, 9040-9049.
- [5] Oleszczuk, P. (2008). Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 496-505.
- [6] Tiquia, S. M., and Tam, N. F. Y. (1998). Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technology* 65, 43-49.
- [7] Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., and De Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.

Práctica 5

Título: Higienización de residuos vitícolas mediante técnicas de compostaje

Objetivo

Eliminar los hongos fitopatógenos de la madera en los sarmientos y restos de poda de la vid, que actúan como fuente de inóculo en la propagación de enfermedades que no tienen tratamiento, utilizando técnicas de compostaje.

Fundamento

Los sarmientos actúan como agente estructurante y aportan carbono en el proceso de compostaje y pueden ser triturados y mezclados con estiércol para producir un compost, incluso en el propio campo [3]. Este sistema de tratamiento/estabilización se puede considerar como una *ecotecnología*, ya que permite el retorno al suelo de la materia orgánica y de los nutrientes vegetales. La eliminación de los hongos patógenos presentes



en los sarmientos mediante procesos de compostaje, bien en la periferia de la viña (compostaje en pilas) [4] o en instalaciones propias de los gestores de estos residuos (compostaje cerrado en biodigestor) [5], tiene como objetivo conseguir un producto o compost totalmente higienizado y de buenísima calidad.

Material y Métodos

Cámara de flujo laminar con UV para la desinfección durante 30 min de los trozos de sarmientos de la poda de la vid (15-20 cm) antes de inocular.

Hongos patógenos (procedentes de colecciones de centros de investigación) para la inoculación de los trozos de sarmientos.

Incubadora para guardar los sarmientos a 25°C en la oscuridad durante un periodo de 2-4 meses.

Marcaje de los sarmientos con bridas blancas para poder recuperarlos del compost.

Obtener y sacar de la masa de compost cinco sarmientos inoculados cada día hasta los 10 días de compostaje y después de 20, 30, 40, 50 y 60 días y desinfectar el material con una solución de lejía de 50% seguida de tres lavado (5 min) con agua destilada.

Medios de cultivo (MEA suplementado con 0,75 ml del acaricida Dieldrin y PDA)

Placas Petri para sembrar 6 astillas/sarmiento/placa y después de una semana repicar 5 discos (8 mm) de agar con micelio para inducir la esporulación [2].

Autoclave

Procedimiento y Resultados

Identificación del hongo patógeno por los caracteres macroscópicos como la textura de las colonias, color de micelio en el medio MEA, la forma de la margen en la placa Petri, así como la morfología de las esporas y células conidiógenas [1]. Calcular el ratio de crecimiento diario del hongo patógeno (tratamiento temperatura/tiempo aplicado) después de un periodo de cuatro o seis días de incubación y medición de los dos diámetros perpendiculares por cada placa (cm/día).

Se estima el porcentaje de inhibición (PI%) diario respecto al control con la siguiente fórmula [1]:

$$PI (\%) = 100(x/y) \quad [1]$$

Siendo:

x = valor medio de las cinco placas sembradas por cada aislado, con cada tratamiento temperatura/tiempo;

y = valor medio de las cinco placas control (8,5 cm)

En el proceso de análisis de la desaparición del hongo patógeno se observa también la presencia de otros microorganismos tales como bacterias mesofilicas del genero *Pseudomonas* (*Bacillus*, *Thiubacillus* y *Enterobacter*) y termofilicas del genero *Actinomycetes*, y especies de hongos (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Fusarium*) responsable de la descomposición de los sarmientos de la vid en las etapas mesofilicas y termofilicas del proceso de compostaje, lo cuales pueden ser cuantificadas como otros hongos y bacterias en el momento que se hace la lectura de las placas Petri (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución del porcentaje de inhibición (PI%) de los microorganismos en sarmientos inoculados durante el proceso de compostaje.

Muestra sarmiento	PI %
-------------------	------



	Hp	Ho	B
I			
M			
T			
F			
Mt			

Hp: hongo patógeno; Ho: otros hongos; B: bacterias; I: fase inicial; M: fase mesofilica; T: fase termofilica; F: final fase bio-oxidativa; Mt: fase de madurez;

Discusión de resultados

1. Explicar la necesidad de llevar a cabo un análisis molecular (PCR) para mejorar la fiabilidad en la identificación de los microorganismos patógenos.
2. Comentar los métodos de higienización de sarmientos de la vid por termoterapia y los procedimientos que se pueden seguir para la determinación de la cinética de muerte térmica de un microorganismo patógeno.

Referencias:

- [1] Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueres, F., Garcia-Jimenez, J. (2001) Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, 325–329.
- [2] Martín, L., Martín, M.T. (2013). Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop Protect.*, 52, 141-150.
- [3] Matei, P.M., Sánchez Báscones, M., Bravo Sánchez, C.T., Martín Ramos, P., Martín Villullas, M.T., García González, M.C., Hernández Navarro, S., Navas Gracia, L.M., Martín Gil, J. (2016) Hygienization and control of *Diplodia seriata* fungus in vine pruning waste composting and its seasonal variability in open and closed systems. *Waste Management*. Doi: 10.1016/j.wasman.2016.08.002. ISSN 0956-053X.
- [4] Matei, P.M., Sánchez Báscones, M., Martín-Villullas, M.T., Diez-Gutiérrez, M.A., García-González, M.C. (2014). Eficiencia del compostaje de sarmientos de vid mediante pilas abiertas como método de higienización. IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 156-160.
- [5] Sánchez Báscones, M., Matei, P.M., Martín Villullas, M.T., Navas Gracia, L.M., Diez Gutiérrez, M.A. (2014) Biodegradación e higienización de sarmientos de vid en biodigestor cerrado discontinuo. IV Jornadas de la Red Española de Compostaje. De Residuo a Recurso: Estrategias de gestión tratamiento y valorización en el Horizonte 2020, 12-14 November 2014, Murcia, Spain. Red Española de Compostaje. pp. 151-160.