



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Microorganismos
eficientes de montaña:
evaluación de su potencial
como fertilizante de
utilidad agronómica**

Alumno: Álvaro Cazalla Jara

Julio, 2021



Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

Microorganismos eficientes de montaña: evaluación de su potencial como fertilizante de utilidad agronómica



Álvaro Cazalla Jara

Jaén, Julio 2021

ÍNDICE

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCIÓN**
 - 2.1. Antecedentes**
 - 2.2. Justificación**
 - 2.3. Hipótesis de trabajo y Objetivos**
- 3. MATERIAL Y MÉTODOS**
 - 3.1. Fuentes de variación**
 - 3.2. Nivel de replicación y unidades experimentales**
 - 3.2.1. Cultivo de plantas de guisante*
 - 3.2.2. Parte microbiológica*
 - 3.3. Procedimiento**
 - 3.3.1. Incubación de las muestras*
 - 3.3.1.1. Preparación de las semillas*
 - 3.3.1.2. Obtención de la cantidad de enmienda y SCG*
 - 3.3.1.3. Montaje experimental*
 - 3.3.1.4. Condiciones de incubación*
 - 3.3.2. Parte Microbiológica*
 - 3.3.2.1. Preparación de los medios de cultivo*
 - 3.3.2.2. Obtención de los extractos*
 - 3.3.2.3. Siembra de la microbiota*
 - 3.3.2.4. Conteo de las placas*
 - 3.3.2.5. Morfología celular y de la colonia*
 - 3.4. Ensayos de laboratorio**
 - 3.4.1. Nitrógeno potencialmente mineralizable*
 - 3.4.2. Test de fitotoxicidad*
 - 3.4.3. Contenidos en carbono y nitrógeno en las enmiendas y la biomasa cosechada*
 - 3.4.4. Valores de pH y conductividad eléctrica*
 - 3.5. Análisis estadístico**
- 4. RESULTADOS**
 - 4.1. Caracterización físico-química de las enmiendas orgánicas**

- 4.2. **Análisis de la fitotoxicidad de las enmiendas y SCG**
- 4.3. **Análisis del N potencialmente mineralizable**
- 4.4. **Contenido de carbono y nitrógeno en la biomasa cosechada**
- 4.5. **Análisis de Componentes principales (ACP)**
- 4.6. **Determinación del número de colonias para medios con SCG**
- 4.7. **Determinación del número de colonias para medios selectivos**
- 4.8. **Resultados de tinción Gram**
5. **DISCUSIÓN**
6. **CONCLUSIONES**
7. **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. RESUMEN

La agricultura cada vez precisa de prácticas más responsables con el medio ambiente, buscando darle nuevas salidas a diferentes tipos de residuos a través del compostaje. De aquí nace la necesidad de conocer el potencial de una nueva técnica de compostaje conocida como Effective Microorganisms (EM), la cual se constituye como una enmienda capaz de favorecer la proliferación de la microbiota, incrementándose en el medio para buscar la movilización de determinados nutrientes en formas poco degradables. A partir de estas premisas, este estudio contrasta el efecto de diferentes enmiendas (mantillos de encinar y pinar, Microorganismos de Montaña sólidos de encinar, compost de alperujo y humus de lombriz) para comparar el crecimiento de plántulas en microcosmos y el papel de la diversidad microbiana mediante la identificación de los grupos funcionales de mayor valor degradativo, aplicando de forma adicional posos de café (Spent Coffee Grounds, SCG) como fuente de materia orgánica poco degradable (compuestos lignocelulolíticos). La enmienda preparada de EM y humus de lombriz muestran respectivamente los mayores beneficios tanto en la degradación in situ de SCG y crecimiento vegetal con respecto a los controles. En términos de grupos funcionales microbianos, destacan MMse por la gran presencia de hongos lignocelulolíticos, y HL destaca por la gran abundancia de actinobacterias.

ABSTRACT

Agriculture increasingly requires more responsible practices with the environment, seeking to give new outlets to different types of waste through composting. Hence the need to know the potential of a new composting technique known as Effective Microorganisms (EM), which is constituted as an amendment capable of favoring the proliferation of the microbiota, increasing in the medium to seek the mobilization of certain nutrients. in slightly degradable forms. Based on these premises, this study contrasts the effect of different amendments (holm and pine mulches, solid mountain holm-oak microorganisms, alperujo compost and worm humus) to compare the growth of seedlings in microcosm and the role of diversity. microbial by identifying the functional groups with the highest degradative value, additionally applying coffee grounds (Spent Coffee Grounds, SCG) as a source of poorly degradable organic matter (lignocellulolytic compounds). The amendment prepared from EM and

vermicompost show respectively the highest benefits both in the in situ degradation of SCG and plant growth with respect to the controls. In terms of microbial functional groups, MMse stands out for the great presence of lignocellulolytic fungi, and HL stands out for the great abundance of actinobacteria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes

En las últimas décadas, los problemas de pérdida de fertilidad, contaminación por fitosanitarios en suelos de carácter agrícola y deterioro de sus ecosistemas, se han acrecentado de manera sin igual debido en gran medida, a las malas prácticas agrícolas (Rosenstein *et al.* (2007)) ya sean por desconocimiento, precariedad económica o simple desinterés. A todo esto se le suma el hecho de que la demanda de alimentos aumenta, ya sea para alimentar el ganado a nivel mundial u otros factores que afectan al crecimiento demográfico humano. Como solución para paliar este problema contamos con una técnica en consonancia con la agricultura de conservación y ecológica conocida como Effective Microorganism (microorganismos efectivos), que consiste en la inoculación de microbiota obtenida de un ecosistema terrestre maduro, principalmente de bosques bien consolidados. Dicha inoculación se realiza mediante la preparación de un sustrato donde prolifera ésta microbiota, y su posterior mezcla con el suelo a tratar en forma de enmienda orgánica que incrementa la tasa de descomposición de la materia orgánica presente en la zona considerada, incrementando de esta manera, la cantidad de nutrientes en forma mineralizada, los cuales son asimilados por las plantas y dando por tanto, un aumento neto de la producción primaria. El potencial de los EM también se extiende al ámbito de la degradación de residuos orgánicos derivados de las actividades humanas como son los restos de comida (Sekeran *et al.* (2017)), entre otros.

Utilizamos el término "microorganismos eficaces" o EM, para denotar cultivos mixtos específicos de microorganismos conocidos y beneficiosos que se utilizan eficazmente como inoculantes microbianos. Este material (EM), una vez que ha sido tratado apropiadamente en el laboratorio, se puede utilizar sólo, como té, aplicándolo al compost, a estiércol animal u otros tipos de materiales orgánicos de tipo "raw" con destino el suelo de cultivo, e incrementar su biodegradabilidad y

liberación de nutrientes esenciales.

En términos generales, los EM se pueden dividir en cinco grandes grupos (Tanya Morocho & Leiva-Mora, (2019)):

1. Bacterias de ácido láctico (BAL) → organismos anaerobios, aerotolerantes que se caracterizan por liberar ácido láctico como metabolito secundario de la fermentación de carbohidratos (Souza *et al.* (2015)). Además, se desarrollan en un amplio rango de pH (Soto *et al.* (2017)).
2. Bacterias fotosintéticas → organismos autótrofos que obtienen C a partir de exudados de la raíz y como fuente de energía emplean la radiación solar o el calor del suelo donde se encuentra (Su *et al.* (2017))
3. Levaduras → organismos más generalistas en cuanto a la fuente de energía. Presentan ciertas sinergias con las bacterias fotosintéticas y BAL debido a que la cadena metabólica que forman da lugar a la formación de compuestos orgánicos con propiedades antifúngicas y antimicrobianas (Meena & Meena (2017)).
4. Actinomicetos → organismos con un cierto parecido a los hongos, de gran utilidad en compostaje debido a su capacidad para solubilizar estructuras vegetales, fúngicas o exoesqueletos de insectos. Además, géneros como *Streptomyces*, se caracterizan por liberar compuestos orgánicos que impiden el crecimiento micelial de ciertos fitopatógenos (hongos) (Chaurasia *et al.* (2017)).

Hongos fermentadores → organismos que se asocian a un incremento del contenido en nutrientes minerales del suelo por su gran actividad descomponedora. Resultan, además, ser antagonistas de un gran número de fitopatógenos. Destacan el género *Penicilium*, en la degradación de la lignina y la celulosa, la capacidad de secretar enzimas extracelulares, tolerantes a pH ácidos y su rápido crecimiento, por lo que son comunes en micro-ecosistemas tropicales (El-Gendy *et al.* (2017)); y por otro lado el género *Trichoderma* por su papel como agentes biocontroladores por competencia o microparasitismo entre otros mecanismos de feedback negativo (Horwath (2017)).

Se ha demostrado que la inoculación de los cultivos con EM al ecosistema suelo/planta puede mejorar la calidad y la salud del suelo, así como el crecimiento, el rendimiento y calidad de los cultivos (Olle & Williams (2013)). Por otro lado, la aplicación foliar de estos EM puede incrementar la producción de biomasa neta producida (Bzdyk *et al.* (2018)).

Esta microbiota desempeña un papel fundamental en el suelo inoculado, como, por ejemplo, favorecer la degradación de compuestos orgánicos y solubilización de nutrientes inorgánicos, actuar como un supresor de posibles enfermedades (fitopatógenos) y por último la inoculación da lugar a un crecimiento exorbitante de las poblaciones de microorganismos fotosintéticos y fijadores de nitrógeno aumentando la eficiencia del cultivo (Higa & Wididana (1991)). Específicamente sobre los cultivos agrícolas se ha constatado una notoria mejora en la germinación de semillas, la floración, el crecimiento y desarrollo de los frutos, la producción bruta biomasa y éxito de reproducción. La inoculación también supone un incremento en la tasa de respiración del suelo (Shin *et al.* (2017)). Este efecto de EM junto con la aplicación de las cantidades correspondientes de NPK para el cultivo, muestra mayores desarrollos vegetativos, en comparación con la aplicación de los fertilizantes NPK sin EM (Javaid & Bajwa (2011)). Otros estudios se centran en la capacidad de los EM para reducir o aliviar el estrés ambiental al que están sometidas las plantas en su entorno natural (Iriti *et al.* (2019)).

La diversidad presente en un preparado de EM compartirá ciertos grupos funcionales microbiológicos y diferirá en otros, en comparación con otros preparados de EM o compost de cualquier índole (Santos *et al.* (2020)).

Todos estos beneficios de la microbiota aplicada se traducen indudablemente en ahorro económico, una disminución de la contaminación de suelos y aguas por agroquímicos, y por supuesto, un incremento de la producción de alimentos destinados tanto al consumo humano como a la ganadería.

2.2. Justificación

De acuerdo con lo anterior, este trabajo se sustenta en base a la necesidad de conocer el potencial de los EM como enmienda orgánica en comparación con sustratos orgánicos y minerales de diversa índole. A todo esto, se le suma el deseo de encontrar formas alternativas para la degradación de ciertos compuestos

orgánicos, limitado en su biodegradabilidad, como puede ser el caso de los posos o residuos de SCG, todo ello por acción de la microbiota existente en la enmienda.

De este modo, se le da un nuevo uso a un residuo que es reservorio de nutrientes que, tras algún proceso de transformación, se hallan disponibles para su posterior absorción por las plantas. Estos posos (Spent Coffee Grounds, SCG) aplicados directamente al suelo mejoran la fertilidad física del suelo y la concentración de materia orgánica (Comino *et al.* (2020)). La fitotoxicidad del medio aumenta proporcionalmente a la concentración de SCG por lo que otro objetivo a lograr es determinar la presencia de potenciales organismos descomponedores de este material recalcitrante, pues de este modo disminuye la fitotoxicidad y aumenta la disponibilidad de nutrientes (Vela-Cano (2019)). Todo ello podría suponer no sólo la conversión de residuos en otros productos comercializables en el ámbito agrícola, sino, además, una puerta hacia un nuevo campo de investigación enfocado en la restauración de paisajes, concretamente destinado a la recuperación del microbiota potencial de la zona en su estado ideal, potenciando de este modo la recuperación de ecosistemas y agrosistemas degradados.

2.3. Hipótesis de trabajo y Objetivos

La hipótesis que aquí se plantea trata de demostrar que el crecimiento vegetal se ve afectado por la biodiversidad microbiana en el suelo, como consecuencia de su capacidad para degradar residuos recalcitrantes como los SCG, y de forma más eficiente frente a otro tipo de enmiendas orgánicas.

Objetivos secundarios:

1. Biodegradar SCG de modo que puedan ser transformados en nutrientes asimilables por las plantas.
2. Estudiar el potencial de degradación de los EM sobre residuos recalcitrantes con escasa biodegradabilidad.
3. Confirmar el papel beneficioso de los EM sobre el suelo y los cultivos
4. Conocer con más detalle el papel de la biodiversidad microbiana en los cultivos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Debido al amplio rango de áreas de conocimiento que son requeridas para abordar este estudio, éste se divide en una parte edafológica, más centrada en el poder de las enmiendas como biofertilizante; y otra parte microbiológica, cuyo objetivo gira en torno a conocer la biodiversidad microbiana presente en cada una de las siguientes enmiendas.

3.1. Fuentes de variación

- a) Sustratos o enmiendas. Para la realización del experimento se ha contado con 5 sustratos de naturaleza variada; compost de alperujo (CA), humus de lombriz (HL), mantillo procedente de un encinar maduro localizado en los alrededores del pantano del Quebrajano (Me), mantillo extraído de los pinares situados en el Parque Periurbano de la Cañada de la Hazadillas, y por último, una enmienda del mismo encinar empleada como biofertilizante a partir de la técnica de EM (Effective Microorganisms) o MM (Microorganismos de Montaña) de acuerdo al manual de Abonos Orgánicos y Biofermentos del Instituto Agro-Eco Louis Bolk de África Oriental (Kalema & Chacón (2010)). En síntesis, éste biofermento sólido de encinar (MMse) se obtuvo mezclando 3 kg de mantillo fresco de encinar (capa O del horizonte Ecto-orgánico del suelo de encinar bien conservado), 2,5 kg de salvado de trigo, 0,25 L de melaza ecológica sin conservantes y 0,75 L de agua destilada. El producto resultante consta de dos partes o tratamientos; uno aeróbico, que se deposita en un recipiente donde se revuelve la mezcla hasta la pérdida completa de calor; y otro anaeróbico, el cual se mantuvo en un recipiente hermético durante 30 días para que alcance la anaerobiosis total. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza una mezcla de ambos tratamientos en proporción 2 (MMse anaeróbico): 1 (MMse aeróbico). La dosis de enmienda fresca a añadir se ajusta a un gramo de C.
- b) Especie fisiológicamente contrastada: Guisante (*Pisum sativum* L.) obtenido en una tienda especializada en la venta de semillas. Esta especie ha sido seleccionada por su rápido crecimiento y metabolismo contrastado, empleando su crecimiento en biomasa radicular y aérea con el fin de

determinar la función de las enmiendas como biofertilizante. El guisante pertenece a la familia botánica Fabaceae/Leguminosae, perteneciendo además al grupo de las herbáceas, por lo que precisan de una buena exposición a la luz solar y proliferan en ambientes prominentemente fríos y húmedos. Como requisitos prefieren suelos sueltos, con un drenaje adecuado.

- c) Posos de SCG (SCG): empleados en distintas concentraciones en función del peso de la enmienda y la vermiculita (sustrato mineral inerte) de modo que el peso final a añadir a la maceta sea de 40 g. Concentraciones empleadas: 0%, 5% y 10%; equivalentes a 0, 2 y 4 g de (SCG) respectivamente.

3.2. Nivel de replicación y unidades experimentales

3.2.1. Cultivo plantas de guisante

El número de réplicas realizadas por combinación de niveles de cada fuente de variación es 3 a excepción del mantillo de encinar que solo tendrá las tres réplicas correspondientes a sustrato para una concentración de SCG del 0%. De modo que si el número de unidades experimentales es de 5 niveles de la fuente de variación Sustratos o enmiendas x 1 nivel de la fuente especie fisiológicamente contrastada x 3 niveles de la fuente de variación SCG x 3 réplicas = 45 unidades experimentales, menos las antes mencionadas para el sustrato de pinar = $45 - 6 = 39$. A esto hay que sumarle tres blancos con diferentes concentraciones de SCG, lo que nos da un total de 41 unidades experimentales.

3.2.2. Parte microbiológica

Para este caso, únicamente se cuenta con los niveles de la fuente de variación enmiendas orgánicas y SCG, de modo, con un número de replicación de 3, al que hay que añadirle los 5 niveles de replicación del factor de dilución. De este modo tenemos que 5 niveles de la fuente de variación enmiendas orgánicas x 3 niveles de la fuente de variación SCG x niveles de la fuente de variación factor de dilución x 3 réplicas = 225 unidades experimentales.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Incubación de las muestras

3.3.1.1. Preparación de las semillas

Previamente a la introducción de las semillas en los microcosmos, éstas fueron sometidas a un pretratamiento consistente en la humectación de las semillas extendiéndose sobre un papel secante saturado con agua destilada colado en una bandeja y cubiertas por otro papel igualmente humedecido. De este modo favorecemos su germinación.



Figura 3.1 Fotos del proceso de germinación de las semillas de guisante.

3.3.1.2. Obtención de la cantidad de enmienda y de SCG a añadir

Existen diferentes criterios en función del material a añadir en las macetas: Para el caso de las enmiendas orgánicas, se ha establecido como criterio la cantidad de carbono. En la siguiente tabla pueden observarse los valores correspondientes a los distintos sustratos. En primer lugar, tenemos el tanto por ciento de humedad gracias al cual se puede obtener el peso seco en porcentaje y luego en tanto por uno (peso seco por gramo de material fresco). A continuación, el porcentaje de C permite obtener los g de C presentes en un g de material fresco, lo cual nos permite ajustar la dosis de enmienda a un g de C.

- Para el caso de los SCG se consideró como criterio el peso total de la mezcla de la enmienda, el propio SCG y la vermiculita, que es de 40 g. De este modo se le aplican porcentajes de 0, 5 y 10, que

corresponden con 0, 2, y 4 g de este residuo.

- Por último, la vermiculita se añade junto con cada enmienda y porcentaje de SCG correspondiente hasta alcanzar los 40 g.

Dichas cantidades se pesaron con balanza de precisión y se mezclaron durante unos 30 segundos para mezclar de forma homogénea todos los componentes de la mezcla como forma de garantizar la representatividad de éstas.

3.3.1.3. Montaje experimental

Ya obtenidas las dosis de enmienda y SCG, y germinadas las semillas tras el pretratamiento se procede al ensamblaje del diseño experimental:

- 1) Suspender entre los dos focos un termómetro por encima de las macetas para conocer la temperatura, pudiendo de este modo colocar los focos de cultivo de 300W en soportes a una altura adecuada que permita mantener una temperatura de 25°C.
- 2) Preparación de las macetas con las distintas cantidades de enmienda, SCG y vermiculita. A las macetas se les añade una rejilla en el interior con el fin de evitar pérdidas de material por los orificios inferiores de la maceta.
- 3) Implementación de las semillas en las macetas: una vez obtenidas las macetas con la mezcla, se plantan 3 semillas por maceta haciendo un triángulo de modo que se maximice la distancia entre las semillas. Cada una de ellas se introduce de forma delicada haciendo un agujero en el material seco. Una vez implantadas en la maceta, se procede a regar las macetas con 100 ml de agua destilada para evitar la desecación de la plántula y favorecer la formación de una estructura edáfica favorable. El agua ha de añadirse cuidadosamente para evitar el surgimiento del SCG en superficie, formando costras superficiales debido a su hidrofobicidad.

- 4) Colocación de las macetas bajo los focos atendiendo al volumen que ocupan en la maceta, de modo que aquellas en las que el borde de la misma estaba por encima del material, se colocan en zonas centrales para evitar la aparición de zonas de sombra. Mientras que aquellas macetas en las que el borde de la misma y la superficie del material se encontraban a la misma altura se posicionan en zonas periféricas, ya que estas no van a presentar zonas de sombra.

3.3.1.4. Condiciones de incubación

Las macetas son posicionadas bajo los focos de cultivo hasta que alcancen un desarrollo considerable (en torno a un mes). Las condiciones de cultivo fueron:

- ❖ Fotoperiodo de 8 horas de luz foco + luz ambiental, 8 horas luz ambiental y 8 horas de oscuridad.
- ❖ Temperatura en torno a los 25 °C y un 63 % de humedad relativa.

Durante el periodo de incubación cada maceta recibió semanalmente 300 ml de agua destilada.



Figura 3.2 Imágenes del montaje experimental y macetas.

3.3.2. Parte Microbiológica

3.3.2.1. Preparación de los medios de cultivo

En primer lugar, se lleva a cabo la preparación de los medios de cultivo de agar-

agar, para ello se pesan g de agar y se procede a su solubilización en 1 L. de agua destilada. Para los medios de cultivo que llevan SCG al 5 y 10 % se pesaron los gramos que equivalen a dichos porcentajes en peso sobre el total junto con el agar-agar y a continuación se procede a su disolución en 1 L de agua destilada. Una vez obtenidas las 3 preparaciones, se llevan al autoclave. Ya finalizado el autoclavado, el siguiente paso es verter cuidadosamente cada preparación en las placas correspondientes atendiendo a evitar cualquier tipo de contaminación realizando el vertido a las placas cerca de un mechero bunsen. Acto seguido, las placas se almacenan en una cámara frigorífica para evitar cualquier contaminación en la medida de lo posible.

Para la preparación de los medios selectivos: en el caso de los hongos y levaduras, se preparan por un lado medios con Rosa de Bengala (RB), y otros con Cloranfenicol (CL); para las actinobacterias se preparan medios con distintas sales (NaNO_3 , K_2HPO_4 , KCl , MgSO_4) con extracto de levadura (ACT) y para las BAL, se preparan medios de cultivo MRS.



Figura 3.3 Fotografía de la placas de Petri para los medios selectivos.

3.3.2.2. *Obtención de los extractos*

Factor de dilución: se realizaran 5 diluciones consecutivas partiendo de un extracto de cada enmienda para su posterior cuantificación. Para inocular las placas con la microbiota presente en las distintas enmiendas, en primer lugar, se pesa 1 g de suelo y se introduce en un tubo de ensayo con 9 ml de solución salina y agitar, de modo que la concentración es de 1:10 , por lo que podemos considerarla como la primera dilución. A continuación, se extrae 0,5 ml de la primera dilución y se añaden a un segundo tubo con 4,5 ml de solución salina,

obteniendo de este modo la segunda dilución y así sucesivamente.

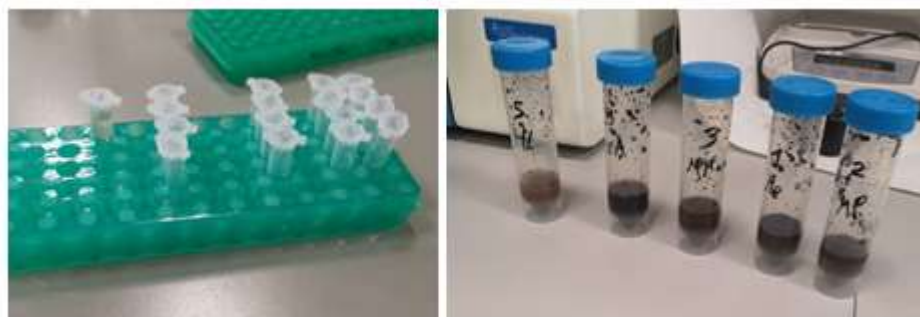


Figura 3.4 Imágenes de las diluciones y extractos de las enmiendas

3.3.2.3. Siembra de la microbiota

Ya obtenidas las diluciones de los extractos, se toman 0,1 ml de cada dilución y se añaden a las placas correspondientes extendiéndose con una espátula de Drigalsky esterilizada con alcohol flameado en la llama del mechero. Tras la inoculación de la microbiota, las placas se introducen en un estufa donde serán incubadas a 30°C durante 72 h.

3.3.2.4. Conteo de las placas

Una vez finalizada la incubación, se extraen las placas del horno y se procede a la selección de aquellas placas que presenten un número de colonias observables entre 50 y 200, una placa por cada tratamiento realizado a las diferentes enmiendas independientemente de la dilución que sea, para obtener las unidades formadoras de colonias en base a la siguiente fórmula:

$$UFC(g) = \frac{n^{\circ} \text{ colonias}}{V(ml)} \cdot Fd$$

Donde Fd es el factor de dilución, y V, el volumen en ml del extracto de siembra.



Figura 3.5 Fotografías de los cultivos microbianos para medios de Rosa de Bengala, SCG y Actinobacterias.

3.3.2.5. Morfología celular y de la colonia

Para los medios de cultivo selectivos, se han seleccionado colonias diferentes, de cada placa, con el fin observar al microscopio la morfología celular, disposición y tipo de Gram (+,-), además de la morfología de la colonia. Para la tinción, se extrae parte de la colonia con una de siembra y se extiende sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada, luego se seca y fija sobre un mechero bunsen. A continuación, se le añade cristal violeta y se deja reposar 2 min, seguidamente se limpia con agua destilada y se añade Lugol, dejándolo 2 minutos, acto seguido se limpia y añade etanol, con el fin de desteñir las membranas celulares, de modo que las gram + mantienen el tinte de cristal violeta y las gram - lo han perdido. A continuación, se adiciona safranina para teñir las gram- de color rojo. Para la descripción de la morfología de la colonia se tuvo en cuenta el brillo, elevación, borde y color de la misma.

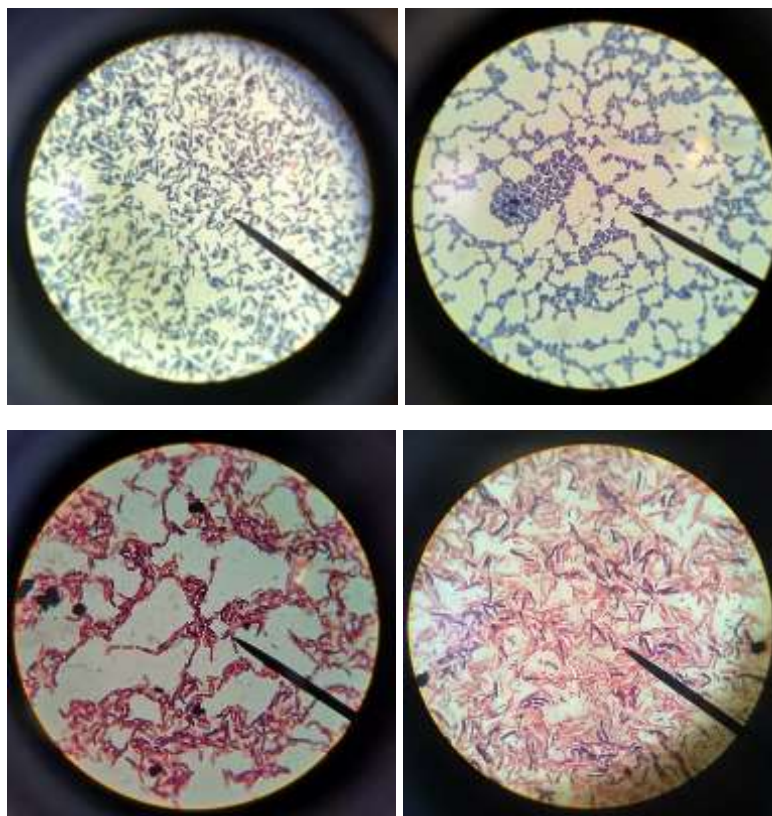


Figura 3.6 Imágenes a microscopio de colonias correspondientes a bacterias Gram + (azul) y Gram – (rojo).

3.4. Ensayos de laboratorio

3.4.1. Nitrógeno potencialmente mineralizable

La tasa neta de mineralización del nitrógeno nos permite comparar el comportamiento de las enmiendas mediante la determinación del nitrógeno

que se muestra disponible a corto plazo.

Método del azul-indofenol: Para conocer el potencial de suministro de N de cada una de las enmiendas orgánicas, éste se determina siguiendo el método propuesto por Kandeler (1995).

- 1) Tomar seis veces dos gramos de cada fuente de materia orgánica y ponerlos en tubos Falcon. A 3 tubos se les añade 15 ml de agua destilada, luego agitar y congelar.
- 2) A otros 3 tubos se les añade 15 ml de agua destilada, agitar y luego incubar a 40°C con agitación (100 rpm) durante una semana.
- 3) Descongelar los tubos, añadir 15 ml de KCl 2M, agitar en la mesa durante una hora, filtrar y analizar la concentración de amonio tras el tratamiento previo con reactivos.



Figura 3.7 Fotografías de los extractos de las muestras, su filtrado, y medida final en espectrofotómetro.

3.4.2. Test de fitotoxicidad

Con el fin de evaluar la posible toxicidad para las semillas de las distintas enmiendas se emplea un índice de germinación (Zucconi et al. (1981)).

El procedimiento seguido para la realización del test de fitotoxicidad consistió en:

- 1) Humedecer el material (60 %) y reposo (30 minutos)
- 2) Añadir 13,5 ml de agua destilada por gramo de muestra seca.
- 3) Agitar durante 30 minutos.
- 4) Centrifugación (4000 rpm, 10 minutos).
- 5) Filtrar con papel de 0,45 μm mediante vacío.
- 6) Colocar 10 semillas en placas de Petri con papel de filtro y añadir 1 ml de

extracto acuoso (10 repeticiones).

- 7) Introducir las placas de Petri envueltas en papel de aluminio en la estufa (2 días a 28°C).
- 8) Añadir 1 ml de la mezcla de etanol y agua.
- 9) Cuantificación número de semillas germinadas y longitud de las raíces por placa.
- 10) Aplicar la fórmula: $GI\% = \frac{G\% \cdot L\%}{100}$

Donde G, es el porcentaje de germinación de las semillas y L el porcentaje de elongación de las raíces.



Figura 3.8 Imágenes de la semillas en placas de Petri antes y después de la incubación para su posterior medida.

3.4.3. *Contenidos en carbono y nitrógeno en la biomasa cosechada*

Una vez finalizado la fase de crecimiento de las plántulas, se procede a la extracción de las mismas de las macetas, para ello, se extrae todo el contenido de la maceta cuidadosamente, y se procede a lavar la zona radicular hasta eliminar cualquier parte de sustrato que se haya quedado adherido a las raíces. Acto seguido se procede a la separación de la parte aérea de la parte radicular de la planta, para su posterior pesaje en balanza de precisión. A continuación, las partes de las plántulas se depositan de forma individual en recipientes de aluminio y se introducen en una estufa a 60°C durante 3 días. Una vez transcurrido ese tiempo se repite la pesada de las muestras para obtener el porcentaje de humedad previo al tratamiento térmico de desecación. De este modo, la diferencia de pesadas nos da el valor de humedad en tanto por ciento. Una vez pesadas, las muestras ya desecadas son pulverizadas con un mortero de acero, a continuación, se lleva a CNHS usando un LECO-TruSpec-CHN 620-100-400 analyser (Servicios Técnicos-SCAI de la UJA).



Figura 3.9 Fotografías de las plantas tras el lavado de raíces y preparación para su pesada.

3.4.4. Valores de pH y conductividad eléctrica

Se pesan 2.5 g de muestra de material en la balanza de 2 decimales y se introducen en un vaso de precipitado. Se añaden 25 ml de agua destilada, en proporción de material-agua 1:10 (w/v). Se agita la suspensión con la varilla a intervalos regulares durante 1 hora. Antes de medir el pH se agita enérgicamente la suspensión.

La extracción se hace en proporción de muestra-agua 1:10 (w/v), con la misma suspensión utilizada para medir el pH, pero la suspensión se filtra con embudo de vidrio y papel de filtro. El líquido obtenido debe estar limpio de elementos en suspensión, de no ser así, deberá filtrarse tantas veces como sea necesario a un bote pequeño y largo de plástico, empleando nuevamente el embudo de vidrio y papel de filtro. Medir la conductividad eléctrica con el conductímetro.



Figura 3.10 Fotografías de las muestras durante el proceso de agitación y posterior medida con conductímetro y medidor de pH.

3.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (Stat Point Technologies, Inc.) para Windows. Los datos se expresan como medias aritméticas y se acompañan de su desviación

estándar. En primer lugar, se determinó el tipo de distribución de las series de datos por medio de la prueba de Kormogorov-Smirnov. La existencia de diferencias significativas debidas a los tratamientos con las diferentes enmiendas orgánicas sobre la biomasa aérea y radicular de las plantas, así como para los contenidos en C, N y C/N de las mismas; y UFC/g para el estudio microbiológico, se comprobó utilizando un ANOVA de una vía y el test a posteriori de Fisher y se utilizó un nivel de significación $\alpha = 0.05$ para distribuciones normales. Para las distribuciones no normales se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Por último, se realizó un análisis de componentes principales para todas las variables del ensayo.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización físico-química de las enmiendas orgánicas

Con los datos obtenidos en la tabla inferior (Tabla 4.1), a partir de los anteriores métodos, podemos observar los valores de N y C expresados en % de las distintas enmiendas orgánicas y posos SCG; su pH y conductividad eléctrica. De modo que basándonos en la relación C/N como criterio para su caracterización obtenemos que enmiendas como el Compost de Alperujo presentan valores comparables a suelos equilibrados con un equilibrio adecuado en la liberación de nitrógeno y el contenido de carbono en el suelo; mientras que el resto de las enmiendas y el SCG presentan valores muy elevados de este índice, lo que asocia con suelos con un exceso de C en forma de biomasa en el suelo y por tanto un exceso de energía. Este tipo de suelo corresponde con los lugares de muestreo de los mantillos de encinar y pinar, los cuales presentan un importante volumen de biomasa potencialmente biodegradable. Por el contrario, el CA y MMse presentan valores ligeramente superiores al valor estimado como óptimo (entre 8,5 y 11,5) por lo que presentan un mayor control en la liberación de nitrógeno mineral. Estas enmiendas son apropiadas para aquellos suelos que presenten una baja relación C/N, a diferencia del CA que puede emplearse en suelos que requieran una mayor liberación de nitrógeno. De modo que en términos de pH, SCG presenta valores de pH fuertemente ácidos, seguidos de valores medianamente ácidos de MMse, lo que lo cataloga como una enmienda propicia para rebajar el pH de suelos muy alcalinos. Luego, Mp es neutro, seguido por Me y HL presentan valores básicos mientras que por otro lado CA es un sustrato alcalino, propio para enmiendas

destinadas a aumentar el pH del suelo.

En términos de conductividad eléctrica (CE) se confirma que ambos mantillos y SCG presentan valores propios de suelos no salinos cuyos efectos sobre el cultivo serán nulos, mientras que CA, MMse y HL se pueden asociar a suelos ligeramente salinos que pueden repercutir negativamente sobre el rendimiento de cultivos sensibles, concretamente CA es el que presenta mayor valor, coincidiendo con Gallart-Martínez (2018).

Tabla 4.1 Contenidos en N, C y relación C/N; valores de pH y conductividad eléctrica de las enmiendas y SCG.

Sustrato	% N	% C	C/N	pH 1:10	CE dS/m 1:10
Me	1,601	31,482	19,665	7,38	0,15
Mp	1,425	41,166	28,884	7,17	0,16
MMse	2,7	37,438	13,868	5,64	2,93
CA	3,256	38,904	11,948	9,27	3,39
HL	1,129	15,586	13,81	7,93	2,61
SCG	2,318	48,988	21,135	5,14	0,19

4.2. Análisis de la fitotoxicidad de las enmiendas y SCG

A partir del procedimiento anteriormente explicado se comparan los valores obtenidos del extracto acuoso de las enmiendas con los controles de agua destilada correspondientes a la longitud de las semillas, los cuales, junto con el porcentaje de germinación nos permiten obtener el Índice de Germinación (GI). Como criterio clasificatorio se estima que valores de GI < 50% representan un medio con una elevada presencia de sustancias con acción fitotóxica. Por el contrario, valores de GI > 80% suponen una escasa presencia de estas sustancias, para finalizar, valores comprendidos entre 50 y 80% corresponden a medios con una existencia media de dichas sustancias (Zucconi *et al.* (1981)). De acuerdo con lo anterior, y aplicado a los datos de la Tabla 4.2 se observa que únicamente el compost de alperujo junto con el SCG muestran valores de GI propios de concentraciones tolerables para no interferir en el crecimiento de las plántulas. Por el contrario, todas las demás enmiendas consideradas en este estudio presentan una capacidad de favorecer el crecimiento de las plántulas, siendo las más notorias el humus de lombriz, seguido del mantillo de pinar. Podemos concluir con que ninguno de los sustratos empleados en este estudio tiene algún tipo de efecto fitotóxico.

Tabla 4.2 Índice de Germinación medido a mano, con ImageJ y promedio de ambas medidas

Muestra	GI (Manual)	GI (Programa)	GI Promedio	Interpretación
CA	0,78	0,71	0,74	Normal
SCG	0,7	0,71	0,7	Normal
HL	1,62	1,69	1,65	Favorece Crecimiento
Me	1,29	1,28	1,28	Favorece Crecimiento
MP	1,52	1,55	1,54	Favorece Crecimiento
MMse	1,1	1,09	1,1	Favorece Crecimiento

4.3. Análisis del N potencialmente mineralizable de las enmiendas

Después de los análisis realizados obtenemos tras medir en un espectrofotómetro la absorbancia de las distintas enmiendas y SCG, que tras sustituir el valor de la absorbancia en la ecuación de la recta patrón, nos permite conocer la concentración de N tanto en las muestras incubadas, como en las congeladas. Durante la medida de las muestras incubadas debido a la elevada concentración de N que presentaban algunas de ellas se les realizó una dilución 1:10 para ajustar la medida correctamente, de modo que se obtienen nuevos valores de absorbancias para las muestras diluidas. La diferencia de N entre las muestras incubadas y congeladas, representa el liberado por la acción de los organismos descomponedores expresado en microgramos de N por grado de enmienda, y en la siguiente columna, expresado en tanto por ciento, para finalmente expresar el N potencialmente mineralizable de la enmienda a través del cociente entre este porcentaje y el porcentaje de N en la enmienda (Tabla 4.3). Dicho N está disponible para las plantas a corto plazo y al tratarse de un recurso limitante, el criterio escogido es que a mayor porcentaje de liberación a corto plazo mayor es el potencial biofertilizante de la enmienda correspondiente para su uso agrícola.

De acuerdo con lo anterior mencionado, son Mp y CA los que muestran valores superiores, lo cual es atribuible a que los micro-ecosistemas existentes en estos suelos muestran una alta capacidad de descomposición de la materia orgánica, es decir, su mineralización y consecuente biodisponibilidad de esta materia para las plantas. A continuación, se encuentra MMse con un valor algo inferior. Por último, aparecen valores prácticamente ínfimos para HL y SCG. En lo referente a HL sus valores de liberación en ambas muestras incubadas y congeladas son similares. Por el contrario, Me presenta valores elevados de liberación per se, no comparable a Mp o CA pero sí representan buena liberación de N.

Tabla 4.3 Determinación del N potencialmente mineralizable.

Muestra	µg N	% N	% N enmienda	% N pot min
Me	218,5476	0,0219	1,601	1,3651
Mp	310,6152	0,0311	1,4252	2,1794
Mmse	218,062	0,0218	2,6997	0,8077
CA	604,8	0,0605	3,2561	1,86
HL	0,624	0,0001	1,1286	0,01
SCG	60,43	0,006	2,3179	0,26

4.4. Contenido de Carbono y Nitrógeno en la biomasa cosechada

En este apartado se tratan los valores relacionados con el diseño experimental de los microcosmos distinguiendo por un lado valores de C, N y C/N y por otro lado los distintos valores de biomasa para la parte aérea de la planta (hoja), parte subterránea (raíz) y total (hoja+raíz) para las distintas enmiendas empleadas en función de la cantidad de SCG añadida.

En primer lugar, hablando en términos de biomasa, para el caso de la parte aérea (Tabla 4.4), se observan en el tratamiento de 0% SCG, diferencias significativas tanto para la biomasa húmeda, como seca y para la humedad, lo que nos indica la heterogeneidad presente en las distintas enmiendas empleadas. En este caso los mayores valores de biomasa se dan en HL y Me, mientras que el porcentaje de humedad presenta mayores valores para MMse, lo que puede ser indicativo de una mayor capacidad de retención de agua y por tanto mayor resistencia al estrés hídrico. Bacelar et al. (2006), relaciona este índice con la capacidad que tiene el olivo para adaptarse al déficit hídrico. Por tanto, hay una mayor eficiencia en la gestión del agua, un aspecto muy importante desde el punto de vista de un más que probable escenario de cambio climático y de gestión hídrica de los cultivos. Para el tratamiento de 5% SCG se observa que, aunque siguen existiendo diferencias significativas entre grupos, éstas son relativamente menores al caso anterior. En este caso, los mayores valores de biomasa son para Me y MMse respectivamente y los de humedad para MMse. Seguidamente, el tratamiento de 10% SCG muestra la pérdida de diferencias significativas entre los grupos a excepción de la humedad, liderados por MMse de nuevo y HL respectivamente.

Luego para el caso de la parte radicular (Tabla 4.4) en términos de biomasa y humedad, se observa a 0% SCG diferencias significativas en biomasa pero no en humedad, encontrando en primer lugar a MMse seguido de HL tanto en biomasa

húmeda como seca. Al incrementar la concentración de SCG al 5% se observa una pérdida notoria de la significación de las diferencias entre grupos, encontrando los mayores valores en CA. Por último, para una concentración de SCG del 10%, se da la misma tendencia que al 5% de SCG para la biomasa, liderada por CA. Sin embargo, vuelven a aparecer diferencias significativas en la humedad, concretamente todos presentan valores similares a excepción de HL que son relativamente menores.

Para el Ratio de biomasa aérea/biomasa radicular (Tabla 4.5), se observa que a 0% SCG existen diferencias notorias para cada enmienda, presentando Me los valores más altos tanto para biomasa húmeda como seca, seguido de MMse. Para una concentración del 5% de SCG se pierde la significación de las diferencias entre grupos, por lo que presentan valores muy similares. Del mismo modo ocurre para una concentración del 10% de SCG, los mayores valores en todos los casos son para Me, HL y MMse.

Para finalizar, con la parte concerniente a la biomasa cosechada, seguimos con los datos de biomasa total (Tabla 4.5). Para el tratamiento de 0% SCG existen diferencias notablemente significativas tanto en biomasa como en humedad, mostrándose los mayores valores de biomasa para MMse, HL y Me respectivamente y mayores valores de humedad para CA y MMse. Al incrementar la concentración de SCG se observa de nuevo la pérdida de diferencias significativas para la biomasa y humedad aunque existe una ligera tendencia para esta última de posibles diferencias entre grupos. Valores Me, HL y MMse para 5%; CA y HL para 10%, todo ello en relación a la biomasa.

Para el caso de los contenidos de C, N y C/N, en relación con el tratamiento 0% SCG, se observan diferencias significativas en la parte aérea (Tabla 4.6), para el N, los mayores valores se muestran con Me y MMse, para el C, serían Me, HL y MMse; la relación C/N, presenta valores más elevados para HL y CA. Al incrementar la concentración de SCG al 5% se pierde cierta significación estadística de las diferencias, encontrando los mayores valores de N para MMse y CA, de C para Me y HL; Y C/N para CA y HL. Por último, con una concentración de 10% de SCG se pierde por completo la significación estadística para el caso de N y C, sin embargo, se conservan para C/N, el cual contiene los valores más altos para CA y HL de nuevo.

Para el caso de la parte radicular (Tabla 4.7), en relación con el tratamiento de 0% SCG, se observan diferencias significativas para N, con valores superiores para MMse, Me y HL; del mismo modo para C, con mayores valores en MMse, HL Me; y C/N, para HL y Mp. El incremento de la concentración de SCG al 5% supone la pérdida total de significación para N y C. Por el contrario, C/N presenta una significación notable, mostrando mayores valores para CA y Me. Por último para el caso de 10% SCG se da la misma situación de pérdida total de significación estadística. C/N muestra mayores valores para CA y Me de nuevo.

Finalmente, en la biomasa total (Tabla 4.8), se observa para el 0% de SCG diferencias significativas para N y C, pero no para C/N. N muestra los mayores valores para MMse y Me; C para Me, HL y MMse. Para el 5% de SCG se pierde la significación estadística aunque existe una ligera tendencia para N y C. Los mayores valores de C/N se dan en CA y HL. Para finalizar, el tratamiento de 10% SCG, presenta la misma tesitura que el caso anterior pero aún más acrecentada. C/N presenta mayores valores en CA y HL.

Tabla 4.4 Datos de biomasa de hoja y raíz para 0, 5 y 10% SCG

Muestra	Hoja			Raíz		
	Biomasa húmeda	Biomasa seca	%Humedad	Biomasa húmeda	Biomasa seca	%Humedad
B1	3,219 ± 0 a	0,670 ± 0 b	79,2 ± 0 a	3,2873 ± 0 a	0,29 ± 0 a	91,2 ± 0 a
Me	5,592 ± 0,716 b	0,969 ± 0,108 c	82,63 ± 0,451 b	7,828 ± 0,954 bc	0,726 ± 0,016 bc	90,6 ± 0,961 a
Mp	3,651 ± 0,307 a	0,631 ± 0,025 b	82,7 ± 1,2 b	6,021 ± 0,371 ab	0,52 ± 0,002 ab	91,3 ± 0,493 a
Mmse	5,587 ± 0,718 b	0,843 ± 0,09 c	84,9 ± 0,361 c	9,278 ± 2,613 c	0,847 ± 0,289 c	91 ± 0,529 a
CA	2,504 ± 0,343 a	0,429 ± 0,062 a	82,87 ± 1,332 bc	6,676 ± 2,754 bc	0,521 ± 0,158 ab	91,8 ± 1,453 a
HL	5,869 ± 1,429 b	0,911 ± 0,107 c	84,17 ± 2,212 bc	8,816 ± 0,884 bc	0,84 ± 0,212 c	90,6 ± 1,504 a
<i>p-Value</i>	0,0003	0	0,0014	0,0083	0,0068	0,6609
<i>F-Ratio</i>	11,56	20,74	8,22	5,32	5,61	0,66
B2	4,321 ± 0 ab	0,760 ± 0 ab	82,4 ± 0 a	6,282 ± 0 a	0,536 ± 0 a	91,5 ± 0 ab
Me5%	5,729 ± 1,447 b	0,983 ± 0,223 b	82,8 ± 0,577 a	7,805 ± 1,192 a	0,767 ± 0,123 a	90,2 ± 0,7 a
Mmse5%	4,423 ± 0,528 ab	0,676 ± 0,074 a	84,7 ± 0,153 b	7,616 ± 0,583 a	0,631 ± 0,05 a	91,7 ± 0,1 b
CA5%	3,355 ± 0,167 a	0,562 ± 0,037 a	82,23 ± 1,007 ab	8,055 ± 2,055 a	0,652 ± 0,107 a	91,7 ± 1,124 b
HL5%	4,523 ± 1,227 ab	0,765 ± 0,15 ab	82,9 ± 1,361 a	7,458 ± 3,53 a	0,668 ± 0,343 a	91 ± 1,012 ab
<i>P Value</i>	0,0893	0,0244	0,0458	0,8162	0,61	0,1402
<i>F Ratio</i>	2,74	4,51	3,6	0,38	0,7	2,22
B3	3,421 ± 0 ab	0,613 ± 0 a	82,1 ± 0 a	6,741 ± 0 ab	0,587 ± 0 a	91,3 ± 0 b
Me10%	3,118 ± 0,731 a	0,506 ± 0,111 a	83,7 ± 0,289 b	6,06 ± 1,048 a	0,517 ± 0,069 a	91,4 ± 0,361 b
MMse10%	3,348 ± 0,445 ab	0,513 ± 0,093 a	84,8 ± 0,833 c	6,78 ± 1,117 ab	0,577 ± 0,118 a	91,5 ± 0,551 b
CA10%	3,964 ± 0,513 ab	0,648 0,097 a	83,7 ± 0,551 b	9,462 ± 1,072 b	0,79 ± 0,152 a	91,7 ± 0,85 b
HL10%	4,113 ± 0,565 b	0,633 ± 0,102 a	84,7 ± 0,416 c	7,269 ± 3,125 ab	0,771 ± 0,36 a	89,6 ± 0,603 a
<i>P Value</i>	0,161	0,2246	0,0005	0,1837	0,3216	0,0049
<i>F Ratio</i>	2,06	1,71	13,75	1,92	1,34	7,38

Tabla 4.5 Datos de biomasa total para 0, 5 y 10% SCG

Muestra	Biomasa		Total		
	Biomasa húmeda Aérea/Radicular	Biomasa seca Aérea/Radicular	Biomasa húmeda	Biomasa seca	Humedad %
B1	0,979 ± 0 c	2,309 ± 0 d	6,506 ± 0 a	0,96 ± 0 a	85,246 ± 0 a
Me	0,729 ± 0,183 b	1,337 ± 0,176 c	13,421 ± 0,241 b	1,694 ± 0,093 b	87,4 ± 0,917 b
Mp	0,606 ± 0,015 ab	1,214 ± 0,048 bc	9,672 ± 0,675 a	1,15 ± 0,024 a	88,1 ± 0,698 bc
Mmse	0,619 ± 0,097 ab	1,047 ± 0,236 ab	14,865 ± 3,26 b	1,69 ± 0,363 b	88,6 ± 0,083 bc
CA	0,419 ± 0,16 a	0,859 ± 0,178 a	9,18 ± 3,04 a	0,95 ± 0,217 a	89,3 ± 1,481 c
HL	0,662 ± 0,109 b	1,11 ± 0,154 abc	14,685 ± 2,21 b	1,751 ± 0,319 b	88,1 ± 0,667 bc
<i>p-Value</i>	0,0021	0	0,0013	0,0008	0,01
<i>F-Ratio</i>	7,54	32,93	8,36	9,25	8,97
B2	0,688 ± 0 a	1,418 ± 0 a	10,604 ± 0 a	1,297 ± 0 ab	87,7 ± 0 ab
Me5%	0,735 ± 0,172 a	1,278 ± 0,181 a	13,534 ± 2,26 a	1,75 ± 0,32 b	87,1 ± 0,65 a
Mmse5%	0,58 ± 0,039 a	1,072 ± 0,047 a	12,039 ± 1,07 a	1,308 ± 0,122 ab	89,1 ± 0,121 b
CA5%	0,443 ± 0,154 a	0,885 ± 0,207 a	11,41 ± 1,91 a	1,215 ± 0,071 a	89,2 ± 1,343 b
HL5%	0,698 ± 0,348 a	1,337 ± 0,667 a	11,981 ± 4,43 a	1,433 ± 0,46 ab	87,8 ± 1,635 ab
<i>P Value</i>	0,3667	0,3178	0,68	0,174	0,0961
<i>F Ratio</i>	1,21	1,35	0,59	1,98	2,65
B3	0,507 ± 0 a	1,046 ± 0 a	10,163 ± 0 ab	1,2 ± 0 ab	88,2 ± 0 b
Me10%	0,511 ± 0,033 a	0,972 ± 0,089 a	9,178 ± 1,78 a	1,023 ± 0,178 a	88,8 ± 0,225 c
MMse10%	0,508 ± 0,138 a	0,931 ± 0,322 a	10,129 ± 0,96 ab	1,09 ± 0,08 ab	89,2 ± 0,292 cd
CA10%	0,42 ± 0,043 a	0,84 ± 0,186 a	13,426 ± 1,44 b	1,438 ± 0,179 b	89,3 ± 0,295 d
HL10%	0,646 ± 0,281 a	0,967 ± 0,47 a	11,328 ± 3,55 ab	1,404 ± 0,428 ab	87,6 ± 0,146 a
<i>P Value</i>	0,4635	0,916	0,1507	0,169	0
<i>F Ratio</i>	0,97	0,23	2,14	2,01	30,71

Tabla 4.6 Datos de N, C y C/N de hoja para 0, 5 y 10% SCG

Muestra	Hoja			
	N%	N(g)	C(g)	C/N
B1	2,387 ± 0 b	0,016 ± 0 cd	0,288 ± 0 b	18 ± 0 a
Me	1,955 ± 0,188 ab	0,019 ± 0,003 cd	0,423 ± 0,043 d	22,5 ± 2,489 abc
Mp	1,81 ± 0,195 a	0,011 ± 0,001 ab	0,272 ± 0,014 b	23,9 ± 1,825 bc
Mmse	2,316 ± 0,16 ab	0,019 ± 0,001 d	0,369 ± 0,033 c	19 ± 1,01 ab
CA	1,81 ± 0,206 a	0,008 ± 0 a	0,186 ± 0,024 a	24,2 ± 2,307 c
HL	1,579 ± 0,359 a	0,015 ± 0,005 bc	0,385 ± 0,04 cd	27,7 ± 5,96 c
<i>p-Value</i>	0,0035	0,0006	0	0,015
<i>F-Ratio</i>	6,62	9,9	25,44	4,52
B2	2,2317 ± 0 b	0,017 ± 0 bc	0,325 ± 0 a	19,2 ± 0 a
Me5%	2,018 ± 0,106 b	0,02 ± 0,006 c	0,431 ± 0,103 b	21,7 ± 0,839 ab
Mmse5%	2,072 ± 0,201 b	0,014 ± 0,002 abc	0,291 ± 0,034 a	20,8 ± 2,086 a
CA5%	1,666 ± 0,21 a	0,009 ± 0,002 a	0,242 ± 0,018 a	26,1 ± 3,163 bc
HL5%	1,626 ± 0,247 a	0,013 ± 0,004 ab	0,322 ± 0,059 a	26,3 ± 4,001 c
<i>P Value</i>	0,0068	0,0305	0,0232	0,0176
<i>F Ratio</i>	6,73	4,17	4,58	5,02
B3	1,811 ± 0 b	0,011 ± 0 a	0,261 ± 0 a	23,5 ± 0 a
Me10%	1,79 ± 0,112 b	0,009 ± 0,002 a	0,218 ± 0,047 a	24,1 ± 1,635 ab
MMse10%	2,036 ± 0,119 c	0,01 ± 0,002 a	0,22 ± 0,041 a	21 ± 1,361 a
CA10%	1,51 ± 0,177 a	0,01 ± 0 a	0,277 ± 0,04 a	28,5 ± 3,44 c
HL10%	1,522 ± 0,099 a	0,01 ± 0,001 a	0,261 ± 0,041 a	27,1 ± 1,801 bc
<i>P Value</i>	0,001	0,4427	0,2843	0,0065
<i>F Ratio</i>	10,8	1,02	1,46	6,82

Tabla 4.7 Datos de N, C y C/N de raíz para 0, 5 y 10% SCG

Muestra	Raíz			
	N%	N(g)	C(g)	C/N
B1	2,469 ± 0 b	0,007 ± 0 a	0,109 ± 0 a	15,3 ± 0 a
Me	2,236 ± 0,129 ab	0,016 ± 0,001 cd	0,269 ± 0,009 c	16,7 ± 1,313 ab
Mp	2,282 ± 0,256 ab	0,012 ± 0,001 b	0,201 ± 0,006 b	17,1 ± 1,364 ab
Mmse	2,366 ± 0,747 ab	0,019 ± 0,001 d	0,279 ± 0,023 c	15 ± 1,621 a
CA	2,346 ± 0,37 ab	0,012 ± 0,002 b	0,191 ± 0,053 b	16 ± 1,596 a
HL	1,777 ± 0,258 a	0,015 ± 0,003 bc	0,272 ± 0,05 c	18,6 ± 1,358 b
<i>p-Value</i>	0,3426	0	0,0002	0,0592
<i>F-Ratio</i>	1,26	17,96	13,14	2,93
B2	2,112 ± 0 a	0,011 ± 0 a	0,2 ± 0 a	17,7 ± 0 b
Me5%	2,229 ± 0,156 a	0,017 ± 0,002 b	0,275 ± 0,03 a	16,2 ± 0,672 ab
Mmse5%	2,543 ± 0,118 a	0,016 ± 0,001 b	0,244 ± 0,021 a	15,2 ± 0,783 a
CA5%	2,184 ± 0,346 a	0,014 ± 0,001 ab	0,227 ± 0,022 a	16,2 ± 0,236 a
HL5%	2,298 ± 0,526 a	0,014 ± 0,526 ab	0,221 ± 0,084 a	15,3 ± 1,444 a
<i>P Value</i>	0,477	0,0868	0,3237	0,0231
<i>F Ratio</i>	0,95	2,78	1,33	4,59
B3	1,835 ± 0 a	0,011 ± 0 a	0,204 ± 0 ab	19 ± 0 b
Me10%	2,399 ± 0,118 ab	0,012 ± 0,002 a	0,2 ± 0,02 a	16,2 ± 1,299 a
MMse10%	2,529 ± 0,17 b	0,014 ± 0,002 a	0,211 ± 0,035 ab	14,6 ± 0,693 a
CA10%	2,084 ± 0,323 ab	0,016 ± 0,004 a	0,274 ± 0,039 b	17 ± 1,917 ab
HL10%	2,009 ± 0,607 ab	0,14 ± 0,006 a	0,216 ± 0,066 ab	15,4 ± 2,119 a
<i>P Value</i>	0,121	0,3554	0,203	0,0328
<i>F Ratio</i>	2,38	1,24	1,81	4,07

Tabla 4.8 Datos de N, C y C/N totales para 0, 5 y 10% SCG

Muestra	Total		
	N (g)	C (g)	C/N
B1	0,023 ± 0 ab	0,397 ± 0 a	17,15 ± 0 a
Me	0,035 ± 0,002 cd	0,692 ± 0,041 b	19,73 ± 1,725 ab
Mp	0,023 ± 002 ab	0,473 ± 0,017 a	20,41 ± 1,426 bc
Mmse	0,038 ± 0,0005 d	0,648 ± 0,057 b	17 ± 1,282 a
CA	0,02 ± 0,002 a	0,377 ± 0,077 a	19,18 ± 1,574 ab
HL	0,029 ± 0,007 bc	0,657 ± 0,089 b	22,91 ± 2,901 c
<i>p-Value</i>	0,0002	0	0,108
<i>F-Ratio</i>	12,72	18,57	4,96
B2	0,028 ± 0 ab	0,525 ± 0 a	18,56 ± 0 ab
Me5%	0,037 ± 0,006 b	0,706 ± 0,124 b	19,1 ± 0,389 bc
Mmse5%	0,03 ± 0,002 ab	0,534 ± 0,054 a	17,58 ± 0,79 a
CA5%	0,023 ± 0,002 a	0,469 ± 0,028 a	20,04 ± 0,727 cd
HL5%	0,027 ± 0,008 a	0,543 ± 0,128 a	20,44 ± 1,156 d
<i>P Value</i>	0,0683	0,0561	0,0068
<i>F Ratio</i>	3,07	3,33	6,73
B3	0,022 ± 0 a	0,465 ± 0 ab	21,28 ± 0 b
Me10%	0,022 ± 0,004 a	0,418 ± 0,067 a	19,54 ± 1,155 b
MMse10%	0,025 ± 0,001 a	0,431 ± 0,043 ab	17,27 ± 1,04 a
CA10%	0,026 ± 0,004 a	0,551 ± 0,069 b	21,2 ± 1,57 b
HL10%	0,024 ± 0,006 a	0,476 ± 0,104 ab	20,14 ± 1,31 b
<i>P Value</i>	0,6165	0,2016	0,0097
<i>F Ratio</i>	0,69	1,82	6,05

4.6. Análisis de componentes principales ACP

Debido a la gran cantidad de variables empleadas en el ensayo de los microcosmos, se lleva a cabo un ACP para obtener un número reducido de componentes que contienen dichas variables, facilitando así la comprensión de los resultados. En primer lugar se muestra la tabla del análisis en la que basándonos en el porcentaje de varianza, se escogen un número de componentes hasta que se alcanza más de la mitad de este porcentaje (Tabla 4.10). En nuestro caso un poco más de dos tercios de la variabilidad son explicados con solo dos componentes.

Una vez obtenido el análisis se obtiene la tabla de pesos de los componentes (Tabla 4.9), la cual nos permite entender la correlación de las distintas variables con los componentes principales. Estos pesos se pueden observar en el gráfico mostrado a continuación (Figura 4.1) donde se representa el componente 1 frente al 2, obteniendo una manera más visual de entender el análisis empleado. Los eigenvalues del ACP producen dos componentes principales que representan el 67,6% de la varianza total de los datos (PC1: 41,71%; PC2: 25,86%). El PC1, se trataría de un componente relacionado con el estatus hídrico, el secuestro de C y la fijación de N. Por su parte, el PC2 es un componente relacionado principalmente con la calidad de la materia orgánica vegetal y su contenido hídrico

Tabla 4.9 Pesos de los componentes.

Variable	Comp 1	Comp 2
Phu Hoja	0,281592	-0,146306
Pse hoja	0,248286	-0,208227
H hoja	0,150577	0,168254
N% hoja	-0,0070538	-0,304687
C% hoja	-0,0105014	-0,159468
N(g) hoja	0,193696	-0,306025
C(g) hoja	0,244235	-0,216898
C/N hoja	0,00639232	0,284104
Phu raíz	0,259501	0,197305
Pse raíz	0,288517	0,131535
H raíz	-0,132514	0,126931
N% raíz	-0,152685	-0,164658
C% raíz	-0,17029	-0,144254
N(g) raíz	0,255976	0,0638736
C(g) raíz	0,288297	0,0983902
C/N raíz	0,0598858	0,105258
Pse a/r	-0,113537	-0,328148
Phu a/r	-0,0323928	-0,346204
Phu total	0,305071	0,0805427
Pse total	0,311774	-0,0332169
H total	0,0332327	0,317875
N (g) total	0,269904	-0,1771
C (g) total	0,295705	-0,101535
C/N total	0,0270406	0,210479

Tabla 4.10 Análisis de componentes principales

Comp n°	Eigenvalor	% de Var	% Acum
1	10,0107	41,711	41,711
2	6,20575	25,857	67,568
3	3,02909	12,621	80,19
4	1,83024	7,626	87,816
5	1,38778	5,782	93,598
6	0,616018	2,567	96,165
7	0,551749	2,299	98,464

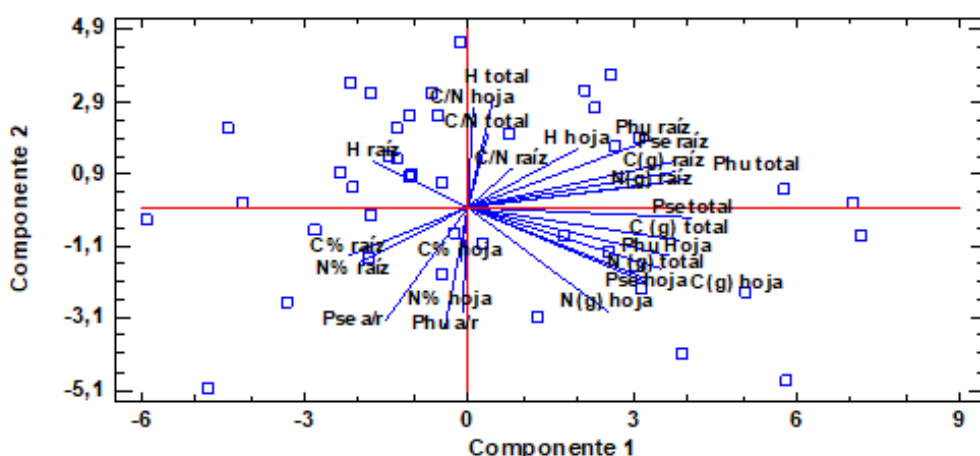


Figura 4.1 Gráfica dispersión de las variables sobre los componentes 1 y 2.

4.7. Determinación del número de colonias para medios con SCG

A continuación se muestran los datos correspondientes al número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de enmienda (Tabla 4.11). Se observa que, UFC es mucho mayor para aquellas muestras correspondientes a TSA, de modo que los medios de cultivo de café constituyen un medio selectivo para microorganismos capaces de alimentarse de él y ser tolerantes a sus características recalcitrantes. Entre los medios con café se observa que a mayor concentración de éste, más decrece el número de colonias surgentes.

MMse presenta los valores más elevados de colonias en TSA, en los medios de café no era posible realizar el conteo de colonias, debido a que estaba cubierta en su totalidad por un cuerpo micelial. Con respecto al resto de las enmiendas, CA presenta un valor en TSA muy elevado, pero el número de colonias en los medios de café es de los más bajos en comparación con Mp que presenta el mayor número de colonias en medios de cultivo con café, lo que indica una mayor presencia de microorganismos capaces de consumir eficientemente este residuo de café. La microbiota presente en HL se ha visto más perjudicada al incrementar la

concentración de café en el medio, decreciendo en un orden de magnitud desde el 5% al 10%. Por último, Me presenta valores elevados para TSA, muy superiores a Mp, pero en medios con café tienen valores relativamente bajos en comparación con el resto de grupos.

Tabla 4.11 Determinación de las unidades formadoras de colonias de cada enmienda.

Muestra	Tratamiento	Factor dilución	Colonias n	UFC/g
Me	5%	100	48	$4,8 \cdot 10^4$
	10%	100	37	$3,7 \cdot 10^4$
	TSA	100000	92	$9,2 \cdot 10^7$
Mp	5%	1000	55	$5,5 \cdot 10^5$
	10%	1000	48	$4,8 \cdot 10^5$
	TSA	10000	153	$1,53 \cdot 10^7$
Mmse	5%	Indet	Indet	Indet
	10%	Indet	Indet	Indet
	TSA	100000	182	$1,82 \cdot 10^8$
CA	5%	100	35	$3,5 \cdot 10^4$
	10%	100	36	$3,6 \cdot 10^4$
	TSA	100000	147	$1,47 \cdot 10^8$
HL	5%	100	42	$4,2 \cdot 10^4$
	10%	10	48	$4,8 \cdot 10^3$
	TSA	100000	41	$4,1 \cdot 10^7$

4.8. Determinación del número de colonias para medios selectivos.

En este apartado se tratan los conteos de los medios selectivos mostrándose en la tabla inferior los valores de UFC/g para los medios selectivos (Tabla 4.12) de Rosa de Bengala (RB) y Cloranfenicol (CL) para la contabilización de hongos, para los cuales también se recogieron datos de número de especies de hongos distintas o "riqueza específica" (Tabla 4.13); "Actinomicetos", que es un medio conformado por distintas sales; y MRS, para bacterias del ácido láctico

Para todos los medios empleados se han detectado diferencias significativas notorias. Para el caso MMse posee la mayor cantidad de UFC/g en todos los medios de cultivo empleados a excepción del medio de Act, por lo que se puede decir que tiene una comunidad microbiológica con gran potencial de crecimiento.

Para RB se muestran valores inferiores que para CL, por lo que siendo ambos para la determinación de hongos, CL es un medio más propicio para su correcto crecimiento. Sin embargo, los datos de riqueza específica para RB y CL indican que

RB es un medio donde a pesar de aparecer un menor número de UFC, pueden proliferar un mayor número de especies de hongos diferentes. Para ambos medios, los valores más bajos de UFC/g se han dado para HL y CA. Los mayores valores de riqueza específica se dan para ambos mantillos, mientras que MMse tiene los peores datos, debido a la presencia de una única especie muy dominante que se hace con toda la placa impidiendo la proliferación de los demás hongos.

El medio de sales para la determinación de actinobacterias, presenta valores superiores de UFC para HL, seguido de MMse y CA cuenta con los valores más bajos.

El medio MRS empleado para el conteo de bacterias del ácido láctico, muestra valores relativamente inferiores al resto de medios, por lo que se trata de un grupo funcional reducido. Los mayores valores de UFC se dan para MMse seguido de Mp. Me y HL presentan valores muy bajos en comparación con el resto de las enmiendas.

Tabla 4.12 Datos de UFC/g para los medios selectivos

Muestra	RB	CL	ACT	MRS
Me	$4,1 \cdot 10^4 \pm 2,5 \cdot 10^3$ a	$4,4 \cdot 10^5 \pm 4,5 \cdot 10^3$ bc	$5,6 \cdot 10^6 \pm 2,2 \cdot 10^6$ a	$8 \cdot 10^3 \pm 1,5 \cdot 10^3$ a
Mp	$4 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^5$ b	$6,7 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^4$ b	$5,7 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$ a	$4,2 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^4$ b
Mmse	$2,4 \cdot 10^6 \pm 3,7 \cdot 10^5$ c	$3,7 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$ c	$2 \cdot 10^7 \pm 0$ b	$5 \cdot 10^6 \pm 5,7 \cdot 10^5$ a
CA	$5,2 \cdot 10^4 \pm 3,7 \cdot 10^3$ a	$5,3 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^3$ ab	$3,4 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^5$ a	$1,7 \cdot 10^4 \pm 6 \cdot 10^3$ a
HL	$2,2 \cdot 10^4 \pm 5 \cdot 10^2$ a	$1,5 \cdot 10^4 \pm 4,5 \cdot 10^3$ a	$4,6 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^7$ c	$7 \cdot 10^3 \pm 4 \cdot 10^3$ a
<i>P-Value</i>	0	0	0	0,0126
<i>F-Ratio</i>	96,55	135,48	39,7	Dist no normal

Tabla 4.13. Datos de riqueza específica para los medios selectivos para hongos.

Muestra	Riqueza específica	
	RB	CL
Me	5	3
Mp	6	3
Mmse	1	1
CA	3	2
HL	4	2

4.9. Resultados de la tinción de Gram

Seguidamente, como análisis de interés cualitativo sobre la identificación de los organismos presentes en las distintas enmiendas (Tabla 4.14 y Tabla 4.15), se realizó una tinción Gram para poder caracterizar a escala microscópica la morfología de distintas colonias seleccionadas entre las distintas enmiendas. Por otro lado se describe del mismo modo la morfología de la colonia a simple vista sobre la placa Petri.

Tabla 4.14 Morfología celular y morfología de las colonias para el medio MRS

Muestra	Morfología de la colonia	Gram (+,-)	Morfología	Disposición
Me	Mate, convexa, borde liso, color blanco sucio	+	Bacilo	No
Me	Mate, elevada, borde rugoso, color blanco claro	+	Bacilo	No
Me	Brillo, convexa, borde liso, color rosa-anaranjado	-	Bacilo	No
Me	Pequeño tamaño, mate, convexa, borde liso, color blanco	+	Coco	En racimos
HL	Translúcida, con elevaciones pequeñas, borde rugoso, color blanquecino	+	Bacilo corto	No
HL	Transparente, brillo, convexa, borde liso	+	Bacilo corto	No
CA	Mate, elevada, borde rugoso, color blanco claro	+	Bacilo corto	En parejas
CA	Billo, convexa, borde liso, color blanco	+	Bacilo	No
Mmse	Brillo, concavo, borde rugoso, transparente	-	Bacilo largo	Agrupaciones ramificadas
Mp	Brillo, convexa, borde liso, amarillo oscurecido	+	Bacilo largo	En cadenas largas

Tabla 4.15 Morfología células y morfología de las colonias para el medio Act.

Muestra	Morfología de la colonia	Gram (+,-)	Morfología	Disposición
CA	Brillo, convexa, borde liso, color blanco	-	Bacilo corto	En parejas
CA	Brillo, convexa, borde liso, color blanco-amarillo	+	Bacilo	No
CA	Brillo, convexa, pequeña, borde liso, color amarillo-blanco	+	Bacilo	No
HL	Mate, cóncavo, liso, blanco sucio	+	Bacilo corto	No
HL	Mate, convexa, borde liso, color blanco intenso	+	Coco	En parejas
Mp	Brillo, convexa, borde liso, color amarillo-naranja	-	Bacilo corto	Masificados
Mp	Mate, convexa, borde liso, color amarillo, pequeño	+	Bacilo corto	No

5. DISCUSIÓN

Partimos del hecho de que los residuos con carácter recalcitrante (poco biodegradables) y fitotóxicos, como los SCG, y que podrían ser utilizados como enmienda orgánica en agricultura, son capaces de incrementar de forma positiva numerosas propiedades físicas y fisicoquímicas del suelo, relacionadas con un gran número de variables de la calidad del suelo (Cervera-Mata *et al.* (2021)). Sin embargo, según Vela-Cano *et al.* (2019), la adición de SCG es capaz de cambiar la estructura de la comunidad bacteriana del suelo y, por lo tanto, podríamos plantear la hipótesis de que la actividad biológica podría interrumpirse debido a la toxicidad de SCG. De modo que, enriqueciendo la enmienda con microorganismos extraídos de suelos de ecosistemas naturales bien conservados, como por ejemplo, el encinar, seríamos capaces de incrementar la biodegradación del material recalcitrante aportado como enmienda, estimular la liberación de nutrientes al medio y potenciar el desarrollo vegetativo del cultivo.

A partir del estudio de los microcosmos se observa que, en términos de biomasa y contenidos de N y C, tanto para la parte aérea, radicular y total, existe una tendencia entre el incremento de la concentración de SCG y la pérdida de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos establecidos por las distintas enmiendas orgánicas empleadas. Por tanto, los ensayos realizados con un 0% SCG muestran diferencias significativas estadísticamente en prácticamente todas las variables consideradas, y esta diferencia va perdiéndose a medida que se

incrementa el contenido en SCG hasta el 10%. Por lo que SCG, pese a ser un material orgánico no considerado como fitotóxico (a partir del índice de germinación, test de fitotoxicidad), y de acuerdo con Cervera-Mata *et al.* (2020), presenta rasgos que limitan el crecimiento vegetal en función de su concentración. De este modo, se puede afirmar que SCG presenta un efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas, siendo este efecto proporcional a la concentración de SCG en el medio empleado, tal y como explica Hardgrove & Livesley (2016).

De modo que SCG es un limitante para el desarrollo tanto vegetal como microbiano, si se considera su aplicación directa sin transformación previa (Comino *et al.* (2017)). Por otro lado, la presencia de diversas colonias en los medios de cultivo con SCG, indica la existencia de microorganismos capaces de subsistir a partir de estos residuos, biodegradándolos, y aportando nutrientes para otros microorganismos presentes en el medio o las propias plantas.

Otra alternativa a la aplicación directa de SCG, sería idear algún proceso de compostaje previo de los SCG, para obtener un producto final que pudiese aplicarse directamente al suelo en forma de enmienda como fuente de nutrientes disponibles a corto plazo o de forma inmediata tras su aplicación, como podría ser la mezcla de SCG con Green Wastes para la elaboración de compost (Zhang & Sun (2017)).

Los medios de cultivo microbianos con SCG indican, de igual modo, la tendencia antes mencionada, mostrando valores superiores de UFC en los medios TSA sin SCG, y observándose una clara reducción para 5% y más aún para 10% SCG. MMse presenta los mayores valores de UFC tanto en TSA como en medios con SCG, lo cual es indicativo de que esta enmienda tiene un fuerte carácter degradativo de materia orgánica de diversa índole, en contraposición con estudios como Mupambwa *et al.* (2016), que muestran la necesidad de crear sinergias con otros microorganismos para obtener un mayor potencial biodegradativo. La surgencia de los cuerpos miceliares en los medios con SCG que cubren toda la placa de Petri, son indicativo de que esta enmienda es la más adecuada para la degradación de compuestos recalcitrantes, pues muestra una adaptabilidad total para su utilización como alimento. CA por su parte, también cuenta con un valor muy elevado en TSA, sin embargo, el número de UFC decae hasta cuatro órdenes de magnitud cuando se exponen a SCG, indicando de esta manera que no es una enmienda muy propicia para mezclar junto con este tipo de residuos, pues una parte considerable de su microbiota se ve afectada gravemente bien por la presencia de determinadas

sustancias de carácter toxicológico para ella, o por la imposibilidad de la misma para utilizar SCG como fuente de alimento. Seguida a esta enmienda se encontrarían respectivamente Me, HL y Mp. Dichas enmiendas presentan un comportamiento similar a CA. En términos generales, se puede afirmar que la adición de SCG a las diferentes enmiendas empleadas produce una proliferación de hongos lignocelulolíticos, los cuales muestran una importante resistencia a polifenoles. Este grupo de microorganismos presenta la capacidad de degradar los diferentes constituyentes de las paredes celulares vegetales (celulosa, hemicelulosa y lignina) en consonancia con Dashtban *et al.* (2010), mediante la producción de diferentes enzimas lignocelulósicas y procesos clave (López *et al.* (2019)). Este grupo funcional de organismos transforma una importante proporción de materiales orgánicos, en recursos de gran importancia agregada para la producción primaria, por lo que son una importante herramienta en bioingeniería aplicada a la degradación de residuos agroindustriales de acuerdo con Kumla *et al.* (2020); permitiendo la liberación de nutrientes indispensables como puede ser el N de acuerdo con Pellitier & Zak (2015). Otro grupo de organismos con ciertas características similares a estos hongos son los actinomicetos, muy característicos en suelos con una elevada proporción de sustancias húmicas, consagrándose como organismos reductores de humus (Kulikova & Perminova (2021)), sino que además se posicionan como importantes productores de enzimas lignocelulolíticas para la degradación de SCG u otros residuos con el mismo carácter recalcitrante (Saini *et al.* (2015)).

Por otro lado, partiendo del estudio realizado con los medios de cultivo para la determinación de los grupos considerados como de gran importancia (BAL, actinos, hongos, levaduras y bacterias fotosintéticas) para una enmienda de EM o enmienda microbiológica, se observa que BAL no destaca en ninguna de las enmiendas empleadas, ya que se no existe un aumento notable de su población. Por el contrario, sí se observa un importante decrecimiento de estos en Me con respecto a su homólogo tratado como enmienda plenamente microbiológica, MMse, lo que es un claro indicativo que tratar Me de este modo produce un crecimiento sin precedentes de la microbiota general de la enmienda. Como sustratos de mayor capacidad para sostener una microbiota más abundante encontramos, por tanto, a MMse como fuente de microbiota lignocelulolítica, y por otro lado, HL como fuente de actinomicetos. De modo que ambas enmiendas pueden añadirse de forma combinada para obtener un mayor efecto potenciador de la degradación de residuos

tipo como SCG combinados con otros compost en consonancia con Emmanuel *et al.* (2017).

El tratamiento de 0% SCG representaría una comparación directa del poder de las enmiendas para el desarrollo y crecimiento vegetal, puesto que no existe el efecto limitante de SCG. Por consiguiente, en base a los resultados para 0% SCG, queda constatado el potencial como enmienda orgánica, por sí sola, de los MMse, tanto en términos de producción neta de biomasa y asimilación de C. Ambos grupos de parámetros nos indican que hay una más apropiada liberación de N, que es el nutriente más limitante para el crecimiento vegetativo (Smill (1999); Blumenthal *et al.* (2008)). Esta premisa queda contrastada a partir de los datos de relación C/N, menores para MMse, lo que implica una mayor asimilación, por parte de las plantas, de N fijado por determinados microorganismos presentes en el medio edáfico y por tanto menor limitación al crecimiento observada en los resultados. Comparativamente, MMse sobrepasa en gran medida a CA y Mp, concretamente el empleo de MMse supone un incremento en la asimilación de N en la planta de un 47% respecto a CA y un 39% respecto a Mp para 0% SCG; y por tanto también en la producción de biomasa en un 44% respecto CA y 32% respecto Mp. Sin embargo, es necesario resaltar que la C/N en todos los casos se encuentra por encima de los valores óptimos (entre 10-14) propios de una mineralización y ruptura rápida de materia orgánica fresca (Lezcano *et al.* (2018)).

Mp y CA serían las enmiendas con peores resultados, en la práctica totalidad de las variables estudiadas (biomasa, humedad y C, N). En primer lugar, se puede observar que a partir de la caracterización físico-química de estas enmiendas, Mp presenta la mayor relación C/N, indicativo de que se trata de un material con una gran acumulación de restos orgánicos ricos en C (exceso de energía) sin mineralizar, y por tanto, relativamente pobres en N, lo que podría explicar su escaso rendimiento observado en los microcosmos. Por otro lado, CA es totalmente opuesto a Mp en relación a C/N, es decir, se corresponde con enmiendas orgánicas con una excelente mineralización de la materia orgánica presente, por lo que existe una mayor presencia de N en formas biodisponibles por las plantas, y por tanto, con mayor calidad. En términos de pH, Mp presenta valores próximos a la neutralidad, posiblemente debido a que las acículas y demás restos vegetales del pino aún no se han descompuesto, y al ser ricos en ácidos orgánicos, acidificando el medio. En contraposición, CA presenta valores de pH medianamente básicos o alcalinos. Por

otro lado, a partir del análisis de la fitotoxicidad, observamos que Mp debería favorecer el crecimiento de manera notable en contraposición con los resultados obtenidos en los microcosmos; y por el contrario CA, que posee valores que indican la presencia normal de sustancias fitotóxicas, similares a SCG, por lo que podría servir para explicar el bajo rendimiento general que existe en el ensayo con guisantes.

Se ha observado un aumento en la tasa de asimilación de CO₂ (parámetro subrogado a partir del aumento del contenido de carbono en las muestras vegetales, y por tanto, del incremento en la tasa de fotosíntesis) especialmente en los microcosmos con Me, HL y MMse. Por consiguiente, si este tipo de residuos orgánicos, y sus respectivos activadores de biodegradación, se incorporan al suelo en forma de enmienda, supondría un incremento neto en la tasa de secuestro de carbono. MMse supera con creces a CA y Mp en la fijación de C (respiración); concretamente un 42% más respecto a CA y un 27% respecto a Mp para 0% de SCG. Por otro lado, se ha observado claramente un menor déficit hídrico en las hojas en aquellas plantas bajo manejo orgánico con incorporación de estas enmiendas (MMse y HL). MMse disminuye el déficit hídrico foliar (mayor retención de humedad en los tejidos de la planta) con respecto a Mp en un 3% y HL con respecto a Mp un 2%. Coincidiendo con Calero *et al.* (2013), sería un aspecto de gran importancia en un ambiente y agro-sistemas tendentes a la aridez, en un más que probable escenario de cambio climático cada vez más acusado. La misma tendencia se aprecia también para la biomasa de la raíz, porque la raíz de la planta, en la cosecha, se quedaría en el suelo de cultivo, fijando carbono directamente. Otro aspecto interesante, es que el carbono cosechado de las plantas de guisante, se encontraba principalmente almacenado en la parte aérea de las mismas, frente a la parte radicular que cuenta con valores inferiores; en concreto, dicha localización diferencial de carbono entre ambas partes de la planta es de un 31% más en la parte aérea que en la radicular. Coincidiendo de este modo con la teoría de Bloom *et al.* (1985), en concreto a lo postulado en su cuarto teorema sobre la asignación de recursos en el interior de la planta. Dicho teorema afirma que la asignación óptima de dichos recursos como puede ser el C se dará en base a las necesidades de recursos para los distintos procesos que tienen lugar en la planta, y cómo los procesos de mayor requerimiento de C se dan en la parte aérea (crecimiento primario, secundario y respiración), frente a los procesos acontecidos en la rizosfera

(absorción de nutrientes y agua, liberación de exudados...); será en la parte aérea de la planta donde se acumule una mayor concentración de C.

Por otro lado, la capacidad de retención de agua, medida a partir del % de humedad de la biomasa vegetal, se ha visto afectada por las distintas mezclas de enmiendas orgánicas con el sustrato mineral inerte (vermiculita). Concretamente, estas diferencias se dan para el análisis de la parte aérea, siendo MMse la enmienda donde las plantas presentan una mayor cantidad de agua retenida. Este índice es relacionado por diferentes autores, como Bacelar et al. (2006), con la capacidad de adaptación de las plantas al déficit hídrico, de modo que mayores valores de este índice con respecto a los controles, indican una mayor capacidad en la gestión y uso del recurso hídrico disponible por las plantas. Dicha adaptabilidad se constituye como un aspecto fundamental en la explotación agrícola dentro de un escenario de cambio climático, como se mencionó anteriormente, enfocado en un aumento paulatino de la sequía y estrés hídrico de las especies vegetales, tanto nativas como cultivadas. Cuanto mayor es el déficit hídrico, mayor es la fuerza de succión que deberán realizar las plantas para obtener agua y, por tanto, tendrán un mayor consumo de energía (Miner (1994)). El empleo de diferentes enmiendas orgánicas mezcladas con suelo, por tanto, reduce las pérdidas de agua por evaporación en los cultivos (Mormeneo *et al.* (2009)), y que también hemos demostrado en nuestro ensayo en microcosmos. El manejo agrícola con enmiendas orgánicas supone un incremento en la tasa de asimilación de carbono y un menor déficit hídrico en las partes aéreas de la planta, lo que implica una gran ventaja en la gestión integrada de los suelos de uso agrícola en ambientes semiáridos (Calero *et al.* (2013)).

6. CONCLUSIONES

- SCG es un residuo que puede ser degradado por la microbiota de las diferentes enmiendas orgánicas empleadas en el estudio, concretamente por los grupos conocidos como hongos lignocelulolíticos y actinobacterias. Su concentración en el medio condiciona su acción como agente fitotóxico.
- Las enmiendas con mayor “biodiversidad” microbiana provocan un mayor crecimiento vegetativo de las especies cultivadas de guisante.
- Los EM quedan consagrados como una enmienda de gran calidad, capaz de competir con enmiendas de diferente tipología, algunas de ellas muy

consolidadas en el mercado como HL. Además, la mayor riqueza microbiológica presente en EM la hace una gran herramienta de biodegradación de compuestos orgánicos recalcitrantes como SCG, transformandolos en nutrientes disponibles para la vegetación presente.

- Mp y CA son las enmiendas peor paradas en términos de crecimiento vegetal y liberación de nutrientes (mineralización inferior de la materia orgánica).
- Se requiere un estudio en mayor profundidad sobre la diversidad microbiológica de las diferentes enmiendas, riqueza específica, abundancias relativas, grupos funcionales, interacciones y redes tróficas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ *Ansorena Miner, J. (1994). Sustratos propiedades y caracterización. Mundi-Prensa.*
- ❖ *Bacelar, E., D. Santos, J. Moutinho, B. Gonçalves, H. Ferreira, Correia, C. (2006). Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. Plant Science 170: 596-605.*
- ❖ *Bloom, A. J., Chapin III, F. S., & Mooney, H. A. (1985). Resource limitation in plants-an economic analogy. Annual review of Ecology and Systematics, 16(1), 363-392.*
- ❖ *Blumenthal, J. M., Baltensperger, D. D., Cassman, K. G., Mason, S. C., & Pavlista, A. D. (2008). Importance and effect of nitrogen on crop quality and health. In Nitrogen in the Environment (pp. 51-70). Academic Press.*
- ❖ *Bzdyk, R. M., Olchowik, J., Studnicki, M., Oszako, T., Sikora, K., Szmidla, H., & Hilszczańska, D. (2018). The impact of effective microorganisms (EM) and organic and mineral fertilizers on the growth and mycorrhizal colonization of Fagus sylvatica and Quercus robur seedlings in a bare-root nursery experiment. Forests, 9(10), 597.*
- ❖ *Calero, J., Cordovilla, M.P., Aranda, V., Borjas, R., Aparicio, C. (2013). Effect of Organic Agriculture and Soil Forming Factors on Soil Quality and Physiology of Olive Trees, Agroecology and Sustainable Food Systems, 37:2, 193-214.*

- ❖ Cervera-Mata, A., Aranda, V., Ontiveros-Ortega, A., Comino, F., Martín-García, J.M., Vela-Cano, M., Delgado, G. (2021). *Hydrophobicity and surface free energy to assess spent coffee grounds as soil amendment. Relationships with soil quality. Catena* 196, 104826.
- ❖ Cervera-Mata, A., Navarro-Alarcon, M., Rufián-Henares, J. Á., Pastoriza, S., Montilla-Gómez, J., & Delgado, G. (2020). *Phytotoxicity and chelating capacity of spent coffee grounds: Two contrasting faces in its use as soil organic amendment. Science of The Total Environment*, 717, 137247.
- ❖ Chaurasia, A., Meena, B. R., Tripathi, A. N., Pandey, K. K., Rai, A. B., & Singh, B. (2018). Actinomycetes: an unexplored microorganisms for plant growth promotion and biocontrol in vegetable crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1-16.
- ❖ Comino, F., Aranda, V., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J. (2017). Thermal destruction of organic waste hydrophobicity for agricultural soils application. *J. Environ. Manage.* 202, 94-105.
- ❖ Comino, F., Cervera-Mata, A., Aranda, V., Martín-García, J. M., & Delgado, G. (2020). Short-term impact of spent coffee grounds over soil organic matter composition and stability in two contrasted Mediterranean agricultural soils. *Journal of Soils and Sediments*, 20(3), 1182-1198.
- ❖ Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W. (2010). *Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. International journal of biochemistry and molecular biology*, 1(1), 36.
- ❖ El-Gendy, M. M. A. A., Al-Zahrani, S. H. M., & El-Bondkly, A. M. A. (2017). Construction of potent recombinant strain through intergeneric protoplast fusion in endophytic fungi for anticancerous enzymes production using rice straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(1), 30-50.
- ❖ Emmanuel, S. A., Yoo, J., Kim, E. J., Chang, J. S., Park, Y. I., & Koh, S. C. (2017). *Development of functional composts using spent coffee grounds, poultry manure and biochar through microbial bioaugmentation. Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(11), 802-811.
- ❖ Gallart Martínez, F. (2018). *La conductividad eléctrica del suelo como indicador de la capacidad de uso de los suelos de la zona norte del Parque Natural de la Albufera de Valencia* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

- ❖ Gamarra Lezcano, C. C., Díaz Lezcano, M. I., Vera de Ortíz, M., Galeano, M. D. P., & Cabrera Cardús, A. J. N. (2018). *Relación carbono-nitrógeno en suelos de sistemas silvopastoriles del Chaco paraguayo. Revista mexicana de ciencias forestales*, 9(46), 4-26.
- ❖ Hardgrove, S. J., & Livesley, S. J. (2016). Applying spent coffee grounds directly to urban agriculture soils greatly reduces plant growth. *Urban forestry & urban greening*, 18, 1-8.
- ❖ Higa, T., & Wididana, G. N. (1991). The concept and theories of effective microorganisms. In *Proceedings of the first international conference on Kyusei nature farming. US Department of Agriculture, Washington, DC, USA* (pp. 118-124).
- ❖ Horwath, W. R. (2017). The role of the soil microbial biomass in cycling nutrients. *Microbial Biomass: A Paradigm Shift in Terrestrial Biogeochemistry. World scientific*, 41-66.
- ❖ Iriti, M., Scarafoni, A., Pierce, S., Castorina, G., & Vitalini, S. (2019). Soil application of effective microorganisms (EM) Maintains leaf photosynthetic efficiency, increases seed yield and quality traits of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown on different substrates. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2327.
- ❖ Javaid, A., & Bajwa, R. (2011). Field evaluation of effective microorganisms (EM) application for growth, nodulation, and nutrition of mung bean. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 443-452.
- ❖ Kalema, J., Chacón, M., 2010. Organic Fertilizers and Bio-ferments. Uganda: Agro Eco Louis Bolk Institute, Eastern Africa Branch.
- ❖ Kandeler, E. (1995) Potential Nitrification. In: Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R (eds) *Methods in soil biology*. Springer, Heidelberg, p 426.
- ❖ Kulikova, N. A., & Perminova, I. V. (2021). *Interactions between Humic Substances and Microorganisms and Their Implications for Nature-like Bioremediation Technologies. Molecules*, 26(9), 2706.
- ❖ Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., ... & Lumyong, S. (2020). *Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. Molecules*, 25(12), 2811.

- ❖ López-Mondéjar, R., Algora, C., & Baldrian, P. (2019). Lignocellulolytic systems of soil bacteria: a vast and diverse toolbox for biotechnological conversion processes. *Biotechnology advances*, 37(6), 107374.
- ❖ Meena, S. K., & Meena, V. S. (2017). Importance of soil microbes in nutrient use efficiency and sustainable food production. In *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 3-23). Springer, Singapore.
- ❖ Mormeneo, I., Aguirre, M. E., Santamaría, R., & Roncoroni, J. (2009). Efecto de enmiendas orgánicas en mezclas con suelo sobre la pérdida de agua por evaporación.
- ❖ Mupambwa, H. A., Ravindran, B., & Mnkeni, P. N. S. (2016). Potential of effective micro-organisms and *Eisenia fetida* in enhancing vermi-degradation and nutrient release of fly ash incorporated into cow dung–paper waste mixture. *Waste management*, 48, 165-173.
- ❖ Olle, M., Williams, I.H., 2013. Effective microorganisms and their influence on vegetable production, a review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 88 (4), 380-386.
- ❖ Pellitier, P. T., & Zak, D. R. (2018). Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: why evolutionary history matters. *New Phytologist*, 217(1), 68-73.
- ❖ Rosenstein, S., Bulacio, L., Giuliani, S., & Panelo, M. (2007). Prácticas y representaciones acerca del "riesgo": el uso de productos fitosanitarios en la agricultura. *Theomai*, (15), 1-20.
- ❖ SANTOS, L. F., Lana, R. P., SILVA, M., Veloso, T. G., Kasuya, M. C. M., & Ribeiro, K. G. (2020). Effective microorganisms inoculant: Diversity and effect on the germination of palisade grass seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.
- ❖ Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., & Yadav, A. (2015). Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. *Enzyme research*, 2015.
- ❖ Sekeran, V., Balaji, C., & Bhagavathipushpa, T. (2005). Evaluation of effective microorganisms (EM) in solid waste management. *Electronic Green Journal*, 1(21).
- ❖ Shin, K., van Diepen, G., Blok, W., & van Bruggen, A. H. (2017). Variability of Effective Micro-organisms (EM) in bokashi and soil and effects on soil-borne plant pathogens. *Crop Protection*, 99, 168-176.

- ❖ Smil, V. (1999). *Nitrogen in crop production: An account of global flows. Global biogeochemical cycles*, 13(2), 647-662.
- ❖ Soto, J. A., Cárdenas, J. A., & García, J. P. (2017). Inoculation of substrate with lactic acid bacteria for the development of *Moringa oleifera* Lam plantlets. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2).
- ❖ Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 401-419.
- ❖ Su, P., Tan, X., Li, C., Zhang, D., Cheng, J. E., Zhang, S., ... & Lu, X. (2017). Photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* GJ-22 induces systemic resistance against viruses. *Microbial biotechnology*, 10(3), 612-624.
- ❖ Tanya Morocho, M., & Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103.
- ❖ Vela-Cano, M., Cervera-Mata, A., Purswani, J., Pozo, C., Delgado, G., & González-López, J. (2019). Bacterial community structure of two Mediterranean agricultural soils amended with spent coffee grounds. *Applied Soil Ecology*, 137, 12-20.
- ❖ Zhang, L., & Sun, X. (2017). Using cow dung and spent coffee grounds to enhance the two-stage co-composting of green waste. *Bioresource technology*, 245, 152-161
- ❖ Zucconi, F., Pera, A., Forte, M y De Bertoli, M. (1981): Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle*, 22: 5