



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Química Agrícola,
Geología y Edafología

**Evaluación de los Gases de Efecto
Invernadero en el Compostaje de Alperujo y
de la Inmovilización de Carbono en su
Aplicación al Suelo**

D^a. Nuria Serramiá Moreno

2013



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS
Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura



UNIVERSIDAD DE MURCIA
Facultad de Química
Departamento de Química
Agrícola, Geología y Edafología

EVALUACIÓN DE LOS GASES DE EFECTO
INVERNADERO EN EL COMPOSTAJE DE ALPERUJO Y
DE LA INMOVILIZACIÓN DE CARBONO EN SU
APLICACIÓN AL SUELO

Nuria Serramiá Moreno

2013

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, la Dra. Asunción Roig García-Ferrández, Investigador Científico del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, y el Dr. Miguel Ángel Sánchez Monedero, Científico Titular del mismo, por su dirección y asesoramiento en la realización de esta tesis doctoral, por todo lo aprendido en este tiempo y por sus esfuerzos y motivación en la elaboración de esta memoria.

Al Dr. Miguel Ángel Sánchez Monedero quiero agradecerle la confianza depositada en mí, así como su incondicional ayuda y el constante estímulo recibido.

A mi tutor, el Prof. Ramón Madrid Vicente, de la Universidad de Murcia, gracias por su tutela, su atención amable y el interés mostrado en la correcta presentación de esta memoria.

El desarrollo de este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración de la Dra. Concepción García-Ortiz Civantos y la Dra. Antonia Fernández Hernández, junto con el personal e instalaciones de la Finca Experimental *Venta del Llano* del IFAPA. Gracias por vuestro buen hacer, por vuestra ayuda en la elaboración de las pilas de compostaje y en las innumerables tomas de muestra de los gases.

A la Prof. Maria De Nobili, de la Università degli Studi di Udine, que me acogió durante dos meses en su equipo del Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, dándome todas las facilidades, quiero agradecerle su interés y contribución al desarrollo de mi tesis doctoral. Al Dr. Marco Contin, gracias por su atención continua. Aldo Bertoni, Andrea Cudini, muchas gracias por vuestra disponibilidad y valiosa asistencia técnica.

Al Dr. Claudio Mondini, quiero darle las gracias por el interés mostrado en mi trabajo y por toda la ayuda y el cariño que tanto él como su esposa, Lorena, me ofrecieron durante mi estancia en Udine.

A la Dra. María de la Luz Cayuela García así como al resto de compañeros del CEBAS y del Dpto. de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, gracias por cada consejo, por las dudas resueltas y por los gratos momentos compartidos.

A mi familia, en especial a mi madre y a mi padre, a Nacho y a mi hijo Pepe, sin ellos no hubiese podido concluir esta etapa.

ÍNDICE

I. OBJETO Y SÍNTESIS.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
II.1. PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA.....	7
II.2. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA.....	8
2.1 SISTEMAS DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE OLIVA Y PRINCIPALES RESIDUOS GENERADOS.....	8
2.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL ALPERUJO.....	11
II.3. SISTEMAS DE VALORIZACIÓN DEL ALPERUJO.....	14
3.1 COMPOSTAJE DEL ALPERUJO.....	16
3.2 USO AGRÍCOLA DEL ALPERUJO.....	21
II.4. IMPACTO AMBIENTAL DEL USO AGRÍCOLA DEL ALPERUJO.....	26
4.1 CICLO DE CARBONO DE LOS SUELOS AGRÍCOLAS.....	28
4.1.1 Importancia de las enmiendas orgánicas en la fijación de carbono en suelos agrícolas.....	30
4.1.2 Mecanismos de fijación de carbono en el suelo.....	32
4.2 EMISIONES DE GASES DE EFECTO INVERNADERO ASOCIADAS AL COMPOSTAJE.....	36
4.2.1 Dióxido de carbono (CO ₂).....	36
4.2.2 Metano (CH ₄).....	37
4.2.3 Óxido nitroso (N ₂ O).....	39
II.5. BIBLIOGRAFÍA.....	43
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	65
III.1. ESQUEMA DE TRABAJO.....	67
III.2. PUBLICACIONES.....	69
2.1 CONTRIBUCIÓN DE LA FRACCIÓN LIGNOCELULÓSICA DEL ALPERUJO A LA DEGRADACIÓN Y HUMIFICACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA DURANTE EL COMPOSTAJE.....	69
2.2 EMISIONES DE GASES DE EFECTO INVERNADERO DURANTE EL COMPOSTAJE DE ALPERUJO CON DISTINTOS SUBPRODUCTOS AGRÍCOLAS.....	81

2.3 MINERALIZACIÓN DEL ALPERUJO EN SUELOS ENMENDADOS: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN LIGNOCELULÓSICA DE LA MATERIA ORGÁNICA SOBRE LA DINÁMICA DEL CARBONO EN EL SUELO.....	93
2.4 CAMBIOS EN EL CARBONO HÚMICO DEL SUELO TRAS LA APLICACIÓN DE COMPOST DE ALPERUJO.....	107
IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	121
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	139
V.1. MATERIALES.....	141
1.1 MATERIALES ORGÁNICOS EMPLEADOS.....	141
1.1.1 Alperujos.....	141
1.1.2 Agentes estructurantes y fuentes de nitrógeno.....	143
1.2. PROCESO DE COMPOSTAJE.....	144
1.3. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	147
1.4. SUELOS.....	147
V.2. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	149
2.1 RESIDUOS ORGÁNICOS Y COMPOST.....	149
2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN LAS PILAS DE COMPOSTAJE.....	163
2.3. ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN SUELO.....	164
2.3.1 Pre-acondicionamiento del suelo.....	164
2.3.2 Incubación de los suelos enmendados.....	165
2.3.3 Análisis de los gases.....	166
2.3.4 Estudio cinético y análisis estadístico.....	168
2.4. ENSAYOS DE HUMIFICACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN SUELO..	170
2.4.1 Pre-acondicionamiento del suelo.....	170
2.4.2 Incubación de los suelos enmendados.....	170
2.4.3 Extracción de las sustancias húmicas.....	171
2.4.4 Separación de las fracciones húmica y no húmica.....	172
2.4.5 C _{OT} de las fracciones húmica y no húmica.....	174
2.4.6 Caracterización de los ácidos húmicos.....	174
2.5. SUELOS.....	176
V.3. BIBLIOGRAFÍA.....	181

APÉNDICE: Abreviaturas..... 185

I. OBJETO Y SÍNTESIS



El compostaje, como tecnología para el tratamiento y la valorización de residuos orgánicos, tiene gran interés debido a su potencial para degradar y estabilizar el contenido en materia orgánica (MO) de los residuos que pueden ser utilizados en agricultura como enmiendas orgánicas.

En la actualidad, la aplicación de compost al suelo puede tener un valor añadido como estrategia para reducir la concentración de CO₂ atmosférico mediante la estabilización de carbono orgánico en el suelo. Con este fin, son de especial interés los residuos ricos en lignocelulosa, cuyo compostaje dará lugar a un material altamente humificado que minimiza la posterior degradación del carbono a CO₂ y favorece la incorporación de la MO del compost al suelo. Así podrá permanecer durante largos periodos de tiempo representando un importante depósito de carbono. Esta estrategia es de especial interés en las zonas de clima mediterráneo y semiárido donde los suelos agrícolas sufren además graves problemas degradativos debido a las pérdidas de carbono orgánico.

El alperujo, residuo procedente de la extracción del aceite de oliva, tiene un alto contenido en lignocelulosa y compuestos fenólicos, características que favorecen la obtención de compost con un alto grado de madurez y estabilidad y que hacen que tenga una gran resistencia a la degradación. Por lo tanto, el uso de este residuo como fuente de carbono, tras su compostaje, tiene importantes implicaciones en la inmovilización de carbono orgánico en el suelo.

Sin embargo, los beneficios netos del compostaje de residuos orgánicos sobre el secuestro de carbono pueden verse contrarrestados por las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) con efectos potenciales negativos sobre el medio ambiente, tales como son el N₂O y el CH₄.

El objetivo global del presente trabajo es evaluar el impacto ambiental del compostaje de alperujo mediante el estudio de las emisiones de GEI generados durante el proceso y del potencial del compost obtenido para la inmovilización de carbono en suelos enmendados.

Así pues, los objetivos parciales de la presente memoria han sido:

- Determinar el efecto de la composición química de la mezcla inicial de residuos sobre la velocidad de descomposición de la MO (duración del proceso) en el compostaje de alperujo.
- Cuantificar la concentración de los gases CO₂, CH₄ y N₂O generados durante el compostaje de alperujo para valorar el efecto de la composición inicial de las pilas y de la fuente de nitrógeno sobre la magnitud de las emisiones.
- Evaluar la influencia de la composición y del grado de estabilización de las mezclas de compost en la estabilización de carbono orgánico en suelos enmendados, simulando condiciones ambientales normales.
- Cuantificar la cantidad de carbono procedente de las enmiendas de compost de alperujo que puede quedar estabilizado entre las diferentes fracciones de carbono húmico del suelo, bajo condiciones óptimas para la mineralización.

Para conseguir estos objetivos, se estudió la evolución de cinco pilas elaboradas a escala industrial empleando distintas proporciones de alperujo, diferentes agentes estructurantes y fuentes de nitrógeno. El sistema de ventilación empleado fue el de pila móvil. Las muestras de los gases CO₂, CH₄ y N₂O se recogieron en la cima de las pilas mediante un sistema de cámara cerrada. Por último se realizaron ensayos con suelos enmendados con las mezclas de compost de alperujo para el estudio de las dinámicas de mineralización y humificación.

Los resultados muestran que el uso de compost de alperujo como enmendante orgánico resulta eficaz en la estrategia de estabilizar carbono en el suelo a largo plazo. Hay un beneficio neto al final del proceso dada la resistencia del material a la degradación durante su compostaje y la baja mineralización de carbono tras su aplicación al suelo. A esto se suma el escaso impacto ambiental de su compostaje controlado, evaluado por la baja emisión de

CH₄

y

N₂O.

II. INTRODUCCIÓN



II.1. Producción de aceite de oliva.

La producción mundial de aceite de oliva supera en la actualidad los 2,8 millones de toneladas (FAOSTAT, 2010). Los principales productores son los países mediterráneos del sur de Europa y del este y norte de África donde se cultiva el olivo (*Olea europaea L.*) desde hace miles de años. La tabla II.1 muestra, para los principales países oleícolas, la evolución de la producción entre las campañas 1991/92 y 2009/10 mediante las medias anuales de los períodos indicados. La Unión Europea encabeza la producción (77%), siendo España el mayor productor de Europa (55%), seguida de Italia (27%), Grecia (15%) y Portugal (2,4%). Francia y Chipre son los siguientes, con una producción un orden de magnitud menor que la de Portugal. El resto de la producción mundial se reparte principalmente entre África (12,5%), Asia (10,5%) y América (0,9%), (FAOSTAT, 2010).

En España, la producción de aceite de oliva ha ido aumentando considerablemente en cada campaña. En la tabla II.2 se puede apreciar la variación de superficies de olivar por Comunidades Autónomas en los años 1991, 2001 y 2011. Así mismo, la tabla II.2 también muestra la evolución de las producciones de aceite de oliva en las diferentes Comunidades Autónomas mediante las medias anuales de los períodos indicados entre 1991/92 y 2010/11 (MAGRAMA, 1991 a 2011). Se puede apreciar como la producción de España está muy condicionada por la aportación de Andalucía, Comunidad donde, con el 62% de la superficie y el 82% de la producción, ésta aumenta de forma constante a razón de 15.800 t/año (Civantos, 2004). La provincia de Jaén es la principal productora (49%) y donde se concentra el 40% de la superficie total destinada al olivar en España. En la Región de Murcia existen en la actualidad 22.915 hectáreas de olivar dedicadas a la producción de aceite de oliva y 47 almazaras en las que se han producido más de 7.500 toneladas de aceite de oliva en 2011 (CARM, 2011).

Tabla II.1 Producción mundial de aceite de oliva. Media anual del período en miles de toneladas.

Países	Producción anual media			
	1991/95	1996/00	2001/05	2006/10
UNIÓN EUROPEA	1.497	1.896	2.148	2.185
España	526	907	1.104	1.221
Italia	580	547	643	557
Grecia	343	397	353	338
Portugal	38	37	37	57
Francia	2	3	4	5
Chipre	2	2	3	2
Otros	5	3	4	5
Croacia	3	3	4	3
ÁFRICA	218	288	255	313
Túnez	145	184	144	162
Marruecos	43	59	58	97
Argelia	23	38	33	35
Libia	7	7	10	13
ASIA	171	299	311	364
Siria	77	119	144	174
Turquía	74	132	113	137
Jordania	11	19	21	18
AMÉRICA DEL SUR	12	10	14	25
Argentina	11	9	13	21
AMÉRICA DEL NORTE Y CENTRAL	1	2	2	4
EE.UU.	1	1	1	2
OCEANÍA	*	*	1	4
Australia	*	*	1	4
TOTAL MUNDIAL	1.899	2.494	2.732	2.894

* Menos de 500 T. Elaborado con datos de FAOSTAT; último acceso, Noviembre 2012.

II.2. Problemática ambiental de la industria oleícola.

2.1 Sistemas de extracción del aceite de oliva y principales residuos generados.

La extracción del aceite de oliva genera un importante impacto ambiental como consecuencia de la gestión inadecuada de los residuos generados durante el proceso. El objetivo de la industria oleícola es el de separar, de la

Tabla II.2 Superficie de olivar y producción de aceite de oliva en España por Comunidades Autónomas.

Comunidades Autónomas	Superficies de olivar (miles de hectáreas)			Producción de aceite de oliva (miles de toneladas)			
	Años			Campañas			
	1991	2001	2011	1991/95	1996/00	2001/05	2006/11
Andalucía	1.279	1.455	1.529	470	795	904	1.012
Castilla-La Mancha	275	311	349	38	65	72	83
Extremadura	251	252	264	23	35	43	49
Cataluña	113	128	118	22	32	30	34
C. Valenciana	95	97	93	15	21	24	25
Aragón	50	57	47	6	10	12	10
R. Murcia	16	21	23	3	5	6	7
Madrid	22	22	24	2	3	4	3
Castilla y León	12	8	8	2	1	1	*
Navarra	10	9	8	1	1	2	2
La Rioja	2	3	6	*	*	1	3
Baleares	2	3	6	*	*	*	1
País Vasco	**	**	**	*	*	*	*

* Menos de 500 t. ** Menos de 500 ha. Elaborado con datos de Anuarios de Estadística Agraria. MAGRAMA.

forma más eficiente, el aceite de los demás componentes de la aceituna sin alterar su composición ni sus propiedades organolépticas.

La aceituna está compuesta por la pulpa (mesocarpo) (70-90%), el hueso (endocarpo) (9-27%) y la semilla (2-3%), encontrándose los dos constituyentes principales, agua (40-50%) y aceite (18-28%), concentrados en la pulpa y la semilla (Beltrán et al, 2004). Los pasos a seguir para la obtención del aceite de oliva son los de limpieza, molienda y batido de la aceituna, y extracción, siendo esta última etapa la parte fundamental de la obtención del aceite (Cayuela, 2004). Hay dos sistemas de extracción: el de prensado o tradicional, prácticamente en desuso, y el de centrifugación, que puede ser de tres y de dos fases (figura II.1).

El impacto medioambiental de la extracción del aceite de oliva por los sistemas tradicional y de centrifugación de tres fases es muy importante debido a la gran cantidad de agua utilizada en el procesado de la oliva, que puede llegar a cuadruplicar la cantidad de aceite producido (IMPEL, 2003). Además,

con el sistema de tres fases surge el inconveniente y la necesidad de tratar o eliminar grandes cantidades de residuos líquidos (alpechines), caracterizados por una elevada carga orgánica con valores altos de demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO) (Fiestas Ros de Ursinos y Borja Padilla, 1992) y una alta concentración de compuestos fitotóxicos tales como fenoles y ácidos grasos (Paredes *et al.*, 1999). Por estos motivos, el sistema de centrifugación de dos fases es el que más se ha extendido en España desde que se implantase a comienzos de los años 90, gracias al desarrollo tecnológico en la industria oleícola dirigido hacia el ahorro de agua durante el proceso de extracción. Por medio de este sistema, que no adiciona agua, se obtienen dos fases tras la centrifugación de la masa de la oliva batida: una líquida, el aceite, y una semisólida, el alperujo, constituido por el agua de vegetación y restos sólidos de la aceituna. La principal ventaja de este sistema es que se elimina la producción de alpechín, disminuyendo un 75% los vertidos de la almazara, aunque tiene lugar la aparición de un nuevo residuo con peculiares propiedades físico-químicas.

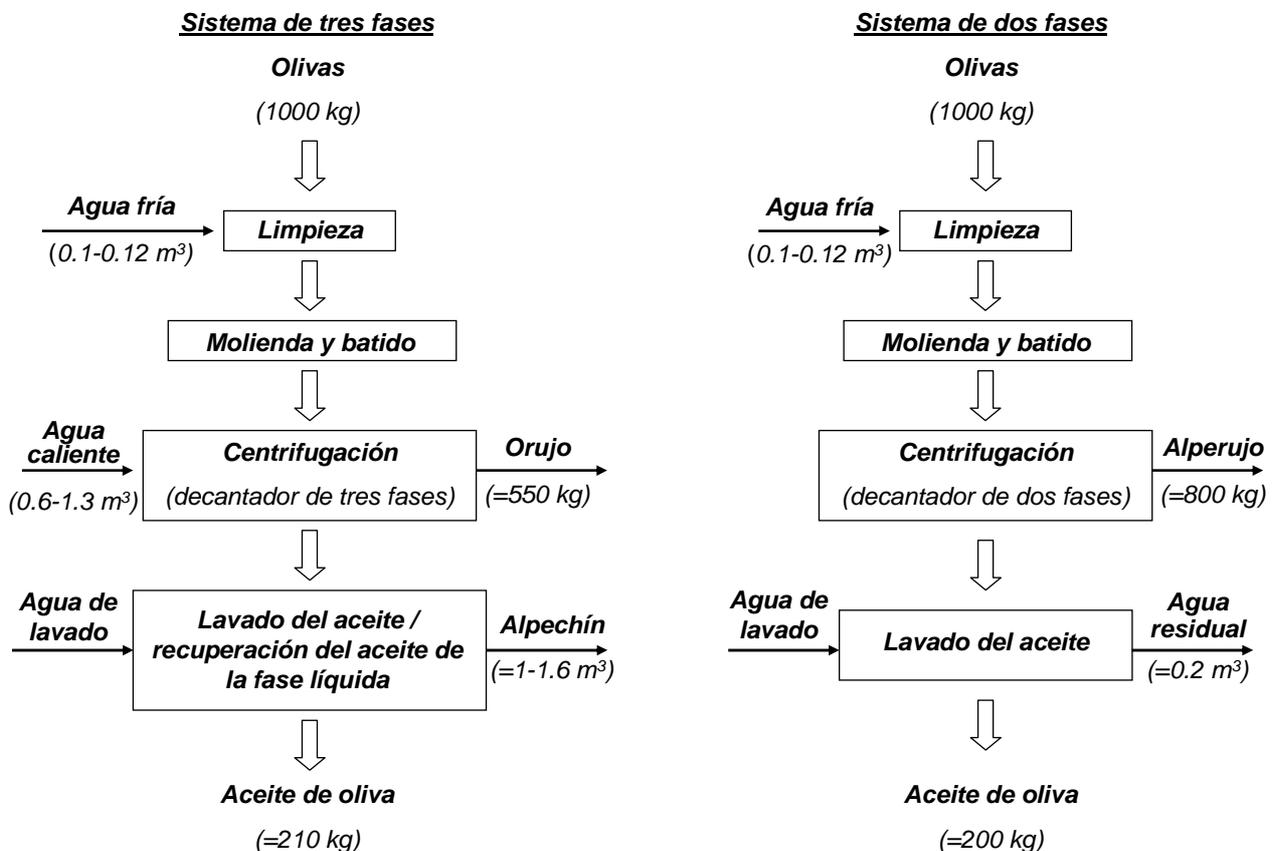


Figura II.1 Esquema de los sistemas de extracción de dos y tres fases. (Adaptado de Albuquerque *et al.*, 2004).

Por cada tonelada de olivas procesadas mediante el sistema de centrifugación de dos fases se obtienen 200 kg de aceite frente a 800 kg de alperujo (Alburquerque *et al.*, 2004). Esto implica que, tomando la producción de aceite de oliva en España en la campaña 2010-11 (1.395.310 toneladas; MAGRAMA, 2012) ese año se produjeron sólo en España más de 5,5 millones de toneladas de este residuo. Además, hay que tener en cuenta que la generación de tal cantidad de alperujo no ocurre de forma gradual a lo largo del año sino en unos pocos meses, entre noviembre y marzo, lo que dificulta enormemente su gestión. La figura II.2 muestra la evolución de la producción de alperujo en España desde el año 2006 hasta la actualidad. El impacto medioambiental del alperujo es un problema al que se enfrentan en la actualidad los productores de aceite de oliva del área Mediterránea y al que tendrán que hacerle frente nuevos productores como Australia, EE.UU y América del Sur (tabla II.1).

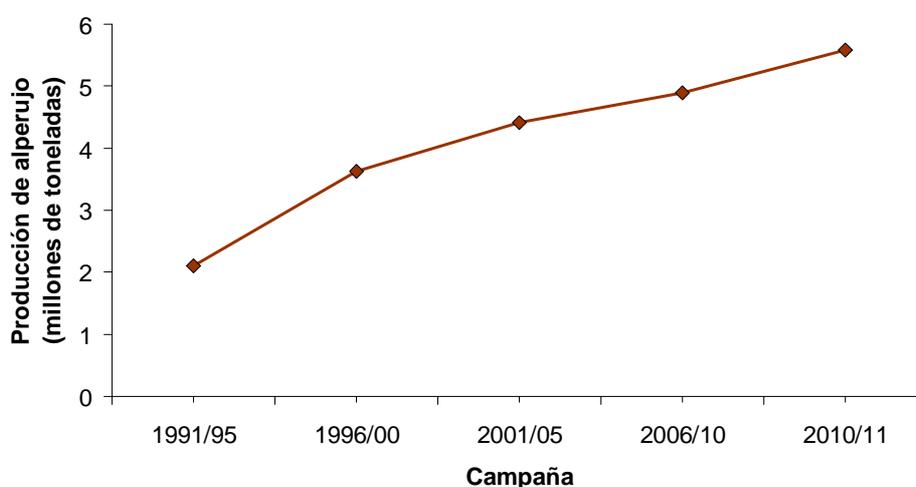


Figura II.2 Evolución de la producción de alperujo en España, basada en una estimación a partir de la producción de aceite de oliva.

2.2 Propiedades físico-químicas del alperujo.

El alperujo está caracterizado por un fuerte olor y una textura pastosa ya que contiene agua, la pulpa de la oliva y trozos de hueso. El mayor inconveniente que presenta el alperujo para su aprovechamiento es su elevada

humedad (55-75%), debido al agua de vegetación de las aceitunas, y su escasa porosidad, lo que hace que el material se compacte impidiendo la aireación y dificultando su transporte, manejo y almacenamiento.

Las propiedades físico-químicas del alperujo han sido estudiadas en profundidad (Alburquerque *et al.*, 2004; Cayuela *et al.*, 2006). Se caracteriza por tener un pH ligeramente ácido y un contenido moderado de nutrientes, siendo especialmente rico en potasio, lo cual es una característica común en los residuos de almazara. El contenido en metales pesados es casi inexistente, con valores inferiores a 1 mg kg^{-1} para Pb, Cd, Cr y Hg (Madejón *et al.*, 1998). Los principales constituyentes de la fracción orgánica son lignina, hemicelulosa y celulosa. Contiene una importante proporción de proteínas y carbohidratos hidrosolubles aunque también posee un alto contenido en polifenoles, lípidos y ácidos orgánicos, compuestos fitotóxicos que inhiben el crecimiento microbiano, la germinación y el crecimiento de plantas, como sucede con el alpechín y restos de las aguas del procesado (Linares *et al.*, 2003; Riffaldi *et al.*, 1997; Saadi *et al.*, 2007). La tabla II.3 recoge las características más habituales del alperujo.

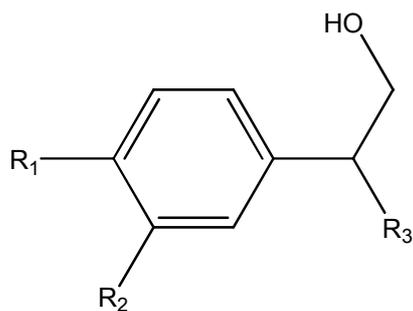
Los fenoles presentes en el alperujo proceden de los sintetizados originalmente por el olivo, donde actúan como defensa frente a una amplia variedad de patógenos (Bianco *et al.*, 2006), y de los formados durante el proceso de extracción del aceite de oliva (Panelli *et al.*, 1991). Numerosos estudios han demostrado que estos compuestos son potentes antioxidantes y que juegan un papel importante en las propiedades químicas, organolépticas y nutricionales del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa (Saija y Uccella, 2000). Por su naturaleza anfifílica, la mayor parte de los compuestos fenólicos (98% del total presente en el fruto) se quedan en la fase acuosa durante el proceso de extracción del aceite pasando a formar parte del residuo. Cuando el residuo se almacena, los compuestos fenólicos tienden a polimerizarse debido a su inestabilidad formando polímeros de alto peso molecular difíciles de degradar. La complejidad de la fracción fenólica en los residuos procedentes de las almazaras ha sido objeto de estudio. En la figura II.3 se muestra un

Tabla II.3 Principales características del alperujo (adaptado de Roig et al., 2006).

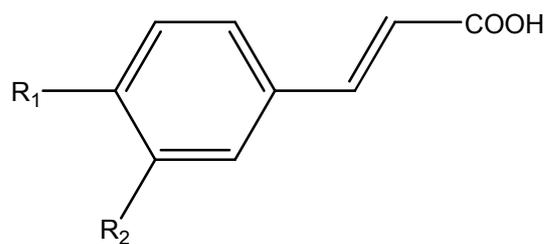
Parámetro	Valor medio	Rango típico
Humedad (%)	64,1	55,6 – 74,5
pH	5,29	4,86 – 6,45
CE (dS m ⁻¹)*	3,89	0,88 – 4,76
MO (%)	93,5	86,0 – 97,6
C (%)	52,8	49,5 – 60,0
C/N	48,2	28,2 – 72,9
Grasas (%)	14,8	7,75 – 36,6
Lignina (%)	43,8	32,3 – 56,0
Hemicelulosa (%)	36,0	27,3 – 41,6
Celulosa (%)	18,6	14,0 – 24,9
Fenoles (%)*	1,22	0,06 – 2,36
Carbohidratos (%)*	9,77	1,29 – 16,4
N _T (%)	1,14	0,7 – 1,84
P (%)	0,12	0,03 – 0,22
K (%)	2,00	0,8 – 3,0

* En extracto acuoso (1:10; p:V). CE: Conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; N_T: Nitrógeno total.

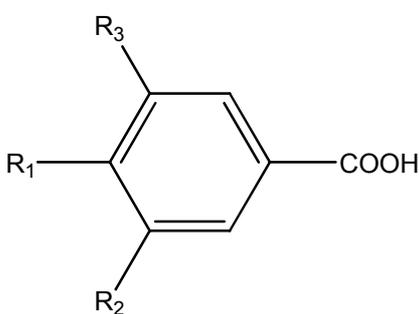
resumen de los principales compuestos fenólicos encontrados en el alperujo. Los compuestos fenólicos más abundantes son tirosol e hidroxitirosol (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002). Lesage-Messen *et al.* (2001) compararon la composición de la fracción fenólica en los residuos de almazara en función del sistema de extracción (sistemas de centrifugación de tres y de dos fases) concluyendo que los perfiles identificados por HPLC eran muy similares en ambos residuos. Los principales fenoles detectados fueron tirosol e hidroxitirosol, además de oleuropeina y los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico, que se encontraron en el alperujo en mayores concentraciones. En menor cantidad se han encontrado también en el alperujo los ácidos vanílico y siríngico (Ait Baddi *et al.*, 2009).



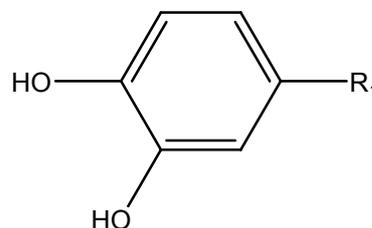
$R_1=OH$ $R_2=H$ $R_3=H$ tirosol
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_3=H$ hidroxitirosol
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_3=OH$ 3,4-dihidroxifenilglicol



$R_1=H$ $R_2=H$ ácido cinámico
 $R_1=OH$ $R_2=H$ ácido *p*-cumárico
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ ácido cafeico
 $R_1=OH$ $R_2=OCH_3$ ácido ferúlico



$R_1=OH$ $R_2=H$ $R_3=H$ ácido 4-hidroxibenzoico
 $R_1=OH$ $R_2=OH$ $R_3=H$ ácido protocatéquico
 $R_1=OH$ $R_2=OCH_3$ $R_3=H$ ácido vanílico
 $R_1=OH$ $R_2=OCH_3$ $R_3=OCH_3$ ácido siríngico



$R_1=H$ catecol
 $R_1=CH_3$ metilcatecol

Figura II.3 Principales compuestos fenólicos presentes en el alperujo.

II.3. Sistemas de valorización del alperujo.

Desde la aparición del alperujo se han propuesto numerosos métodos para su valorización. En una revisión realizada por Roig *et al.* (2006) se describen las técnicas más importantes utilizadas con tal fin: operaciones físicas de secado y segunda extracción de aceite con disolventes, procesos físico-químicos de combustión y gasificación para la producción de energía, procesos biotecnológicos como la digestión anaerobia, la fermentación sólida o el compostaje con otros subproductos agrícolas y la extracción de compuestos de alto valor añadido como pectinas y fenoles. Morillo *et al.* (2009) hacen una amplia revisión sobre el conjunto de tratamientos biológicos posibles para los

residuos de las almazaras con el fin de valorizarlos mediante la producción de biopolímeros, biocombustibles, antioxidantes y enzimas.

En la actualidad, el uso del alperujo como combustible para la generación de energía térmica o eléctrica es la opción mayoritaria, así las plantas de generación eléctrica a partir de este residuo están muy afianzadas en el sector. En Andalucía hay 19 plantas que utilizan biomasa para generar energía eléctrica, 12 de las cuales emplean el alperujo, o el orujillo (residuo sólido procedente de una segunda extracción de aceite) como combustible. Su producción representa el 1,46 % del total de energía eléctrica disponible en esta Comunidad Autónoma (García-Maraver *et al.*, 2012). Esta opción es económicamente rentable y ha supuesto una reducción de un 8 % aproximadamente en las emisiones de CO₂.

El uso agrícola del alperujo como enmendante orgánico de suelos también tiene un gran potencial principalmente en los países del área Mediterránea y sur de España debido al bajo contenido en carbono orgánico de los suelos de estas regiones que necesitan aporte de MO para frenar los graves procesos de erosión y degradación (Albaladejo *et al.*, 2012). En concreto, el cultivo del olivo es una de las actividades agrícolas que genera mayores pérdidas de suelo debido a diversos factores intrínsecos al olivar, como son: el cultivo en suelos en pendiente; la climatología de tipo mediterráneo, alternándose épocas muy secas con otras lluviosas en las que se producen precipitaciones de gran intensidad en cortos períodos de tiempo; suelos arcillosos con baja velocidad de infiltración y con problemas de hidrofobia cuando se producen lluvias tras un período seco; la escasa cobertura del suelo por la copa del olivo; y los sistemas de cultivo que eliminan sistemáticamente la cubierta vegetal herbácea (Pastor, 2004). Como ejemplo, más de 80 t ha⁻¹ de suelo se pierden anualmente en los cultivos leñosos de Andalucía (López-Cuervo, 1990). La MO desempeña un papel crucial en la protección del suelo frente a su erosión, desertificación y pérdida de fertilidad (Stevenson, 1994; Tate, 1987). Su función es clave en el mantenimiento de la estructura del suelo, mejora la infiltración de agua de lluvia y posee propiedades reguladoras del pH, esenciales para mantener tanto la calidad del

suelo como la del medioambiente en general. El reciclado del alperujo como enmendante orgánico en el suelo es una práctica agraria adecuada encaminada al uso y al desarrollo sostenible de la agricultura. En el propio olivar contribuye además a mantener el equilibrio entre los nutrientes extraídos por el árbol y su retorno al suelo, lo que permite cerrar el ciclo de nutrientes, roto en muchas ocasiones por descuidar la revalorización de los residuos orgánicos.

3.1 Compostaje del alperujo

El compostaje es un proceso biológico de descomposición aeróbica de la MO en condiciones controladas que permiten el desarrollo de fases termófilas alcanzando temperaturas de hasta 70 °C. Así se genera un producto estable humificado cuya característica más destacable es su mayor resistencia a posteriores procesos de descomposición. Además se generan gases, vapor de agua y calor, derivados del metabolismo microbiano (figura II.4). Para la iniciación del proceso se requieren las condiciones nutricionales y ambientales óptimas para que la población microbiana se desarrolle y sea lo más variada posible. Estos requisitos son:

- Equilibrio aire/agua: el aporte de oxígeno es de vital importancia ya que el tipo de metabolismo predominante es el aeróbico, por lo que debe ser suministrado mediante volteos o aireación forzada. Los volteos además reducen el tamaño de partícula y homogeneizan el material, dejando nuevas superficies disponibles para el ataque microbiano. Por su parte, el agua favorece la migración y la colonización de los microorganismos y es esencial para la difusión de los productos del metabolismo microbiano.

- Equilibrio biopolímeros/nutrientes: La relación entre la cantidad de carbono y nitrógeno en la mezcla inicial debe cuidarse para ajustar la nutrición de los microorganismos. Una relación C/N inicial óptima para que el sustrato soporte el crecimiento de los microorganismos sin pérdidas de nitrógeno es de 25-35.

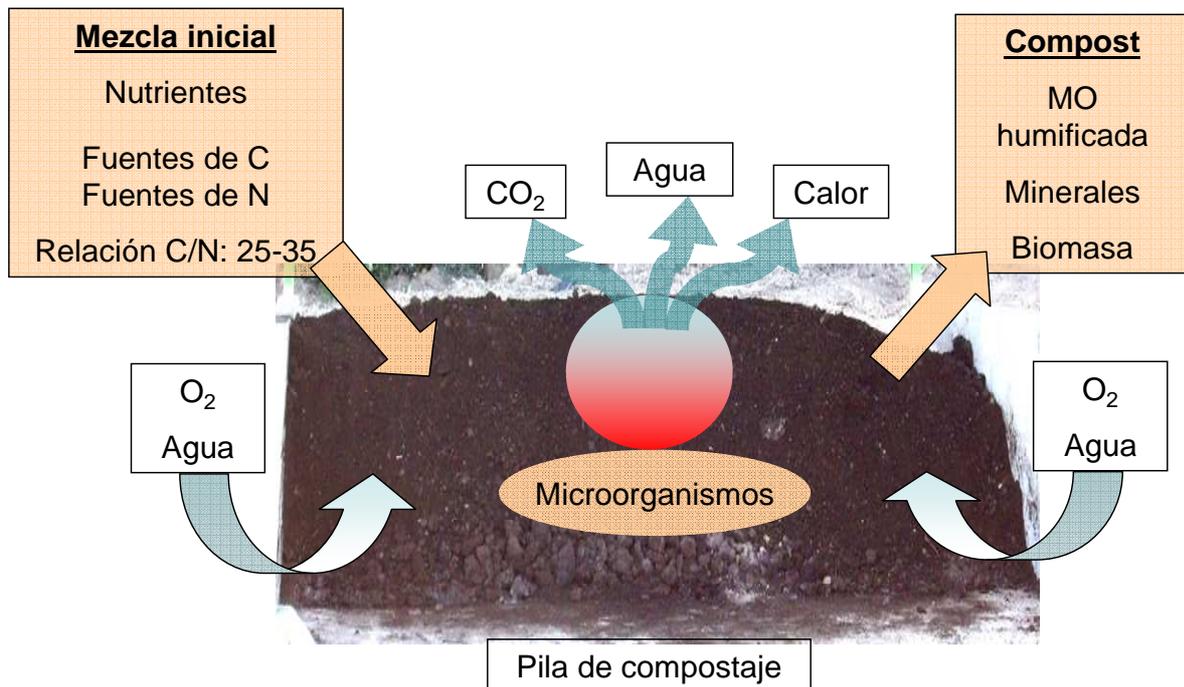


Figura II.4 Esquema general del proceso de compostaje.

La pila de compostaje constituye un ecosistema en el que diversas poblaciones microbianas (bacterias, hongos y actinomicetos) utilizan la MO como fuente de carbono y de energía en presencia de oxígeno. Parte de la energía generada se disipa en forma de calor que queda atrapado en el material produciéndose un efecto de retroalimentación (Moreno y Mormeneo, 2008). De este modo, la temperatura va aumentando hasta que sólo sobreviven algunas bacterias cuya actividad metabólica es insuficiente para mantener la temperatura y ésta comienza a descender. Las variaciones térmicas durante el compostaje permiten reconocer tradicionalmente cuatro fases en el proceso (figura II.5): fase mesófila (10-45 °C); fase termófila (45-70 °C); fase de enfriamiento o segunda fase mesófila; y fase de maduración. Como consecuencia, se suceden en el tiempo distintas poblaciones microbianas mesófilas (crecimiento entre 10 y 40 °C) y termófilas (crecimiento entre 40 y 70 °C). Las primeras etapas comprenden la fase bio-oxidativa o de crecimiento activo de los microorganismos, en la que existe una elevada disponibilidad de nutrientes. En la etapa de maduración los mecanismos de descomposición

microbiana ocurren de forma muy lenta debido al agotamiento de los compuestos fácilmente biodegradables. A través del desarrollo de temperaturas termófilas se persigue a su vez la eliminación de patógenos y sustancias orgánicas fitotóxicas presentes inicialmente en el residuo o formadas durante las primeras etapas del proceso, para que el compost final pueda ser utilizado sin implicar riesgos medioambientales (RD 824/2005 de 8 de julio sobre productos fertilizantes). Un proceso de compostaje bien controlado y aplicado a los materiales adecuados reduce la humedad, el peso y el volumen de los residuos tratados y conduce a un producto estabilizado fácil de almacenar y transportar y que puede ser utilizado como abono orgánico en cualquier tipo de suelo (Soliva *et al.*, 2008).

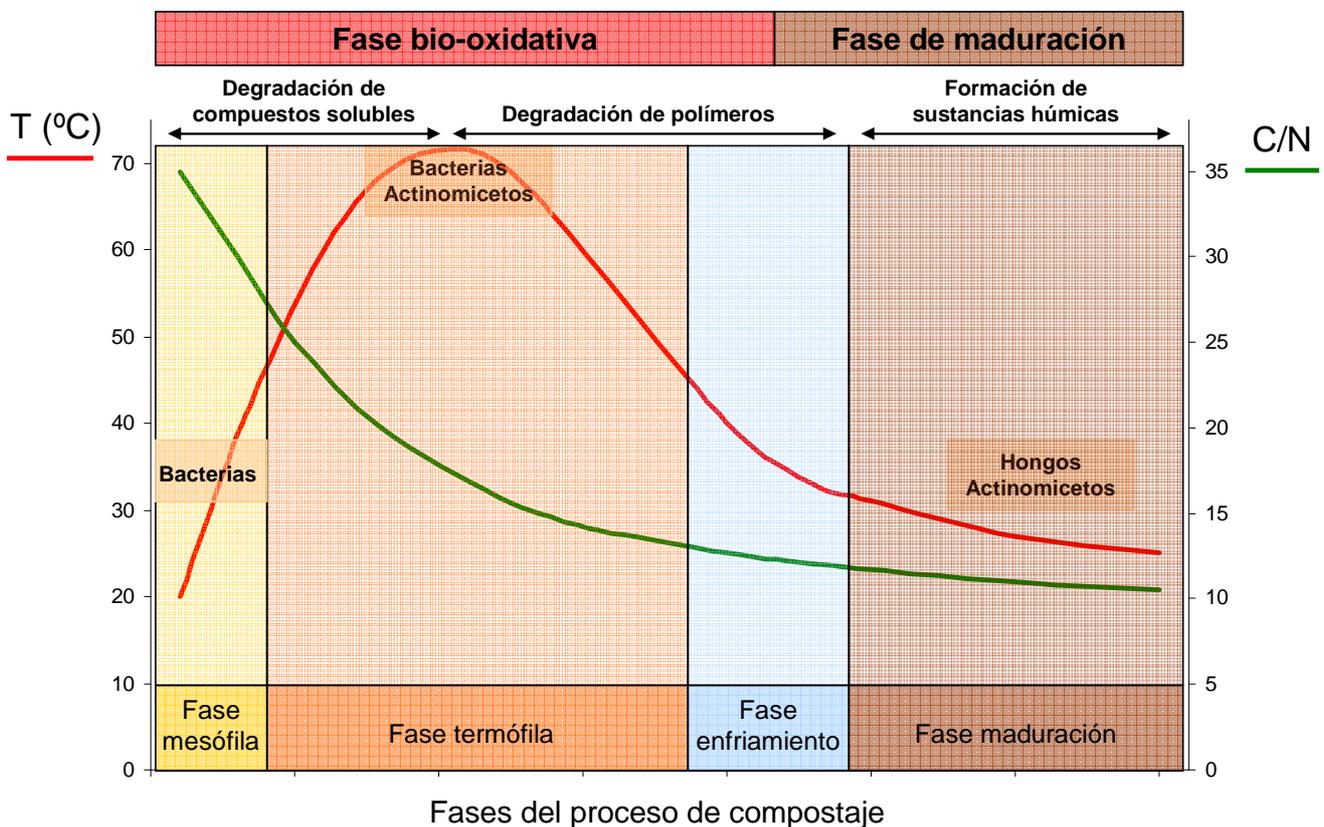


Figura II.5 Descripción del proceso de compostaje. (Adaptado de Moreno y Mormeneo, 2008).

El alperujo es un material de buena calidad para producir compost debido a su elevado contenido en MO y nutrientes (Apartado 2.2). A pesar de ello, el proceso presenta limitaciones que son consecuencia de otras

características físico-químicas del residuo que dificultan su compostaje, siendo el principal inconveniente la larga duración de la fase termófila. Son varios los factores que provocan que la transformación de la MO contenida en el alperujo sea muy lenta. En primer lugar, la textura pastosa y elevada humedad causan la compactación del material limitando tanto la presencia de oxígeno como su circulación. Una aireación insuficiente provoca una sustitución de los microorganismos aerobios por anaerobios, con el consiguiente retardo en la descomposición, además de la aparición de malos olores debido a la producción de sulfuro de hidrógeno. En segundo lugar, la composición química del alperujo está basada principalmente en compuestos lignocelulósicos (tabla II.3) siendo la lignina el componente mayoritario. El alto contenido en lignina del alperujo y el grado de unión de este componente a otros constituyentes orgánicos (celulosa y hemicelulosa) dificulta la capacidad de los microorganismos y sus enzimas para degradar el alperujo ya que, para que se produzca la degradación de la celulosa y hemicelulosa, la lignina debe ser degradada por lo menos en parte mediante la actuación de enzimas ligninolíticas. El alperujo tiene además una baja concentración de nitrógeno, el cual se encuentra principalmente en la fracción orgánica, con lo cual su disponibilidad es muy baja y representa una limitación para la nutrición y la actividad de los microorganismos. Por último, la presencia de fenoles hace que el residuo tenga propiedades antimicrobianas, al menos durante las primeras etapas del proceso: los fenoles de bajo peso molecular son conocidos por tener propiedades antimicrobianas y fitotóxicas mientras que los de elevado peso molecular se ha visto que inhiben el efecto de enzimas ligninolíticas como la lignina-peroxidasa en hongos y bacterias (Sayadi *et al.*, 2000).

Sin embargo, la lignina tiene una importancia capital en el proceso de compostaje debido a su participación en la formación de las sustancias húmicas. La despolimerización de la lignina (ruptura de los enlaces entre las diferentes subunidades de fenilpropano que la constituyen) produce una gran variedad de compuestos aromáticos (ácidos, alcoholes y fenoles) algunos de los cuales son mineralizados y otros, concretamente los intermedios fenólicos, participan activamente en la formación de los compuestos húmicos (Lewis y Yamamoto, 1990). Durante la humificación, aumenta el porcentaje de

sustancias húmicas frente al total de MO por lo que la cantidad y la calidad de las sustancias húmicas presentes en una enmienda orgánica son importantes indicadores de su madurez y estabilidad (Sánchez-Monedero *et al.*, 2002; Senesi *et al.*, 2007). En este sentido, durante el compostaje de alperujo se han descrito intensos procesos de humificación relacionados con el alto contenido en lignina y compuestos fenólicos del residuo que han dado lugar a un compost con un alto grado de madurez y estabilidad en las fracciones de ácidos húmicos y fúlvicos las cuales presentan características típicas de las sustancias húmicas del suelo (Plaza *et al.*, 2005, 2006).

El control y la optimización de la fase termófila en el compostaje de alperujo se consigue utilizando en la mezcla inicial agentes estructurantes adecuados y fuentes de nitrógeno que ayudan a que el proceso sea eficiente y se desarrolle de forma correcta. Numerosas experiencias de compostaje de alperujo han demostrado la eficacia de la adición de diferentes residuos o subproductos agroindustriales para corregir el exceso de humedad, evitar la compactación del material y conseguir una adecuada relación C/N inicial. Como agentes estructurantes se han empleado: hojas y ramas de olivo, virutas de madera (Alburquerque *et al.*, 2009; Manios *et al.*, 2006); poda de vid (Alburquerque *et al.*, 2009; Cayuela *et al.*, 2008b, 2010); paja (Ait Baddi *et al.*, 2009; Altieri y Esposito, 2008, 2010); restos de poda, hojas de lechuga (Montemurro *et al.*, 2009); serrín (Altieri y Esposito, 2008; Montemurro *et al.*, 2009), residuos textiles de lana (Altieri y Esposito, 2008, 2010) y fibras de algodón (Alburquerque *et al.*, 2007, 2009). Como fuentes de nitrógeno se utilizan estiércoles de distinto origen: estiércol de oveja (Cayuela *et al.*, 2008b; Montemurro *et al.*, 2009); estiércol de vaca (Alburquerque *et al.*, 2011; Pardo *et al.*, 2011); o estiércol de aves de corral (de la Fuente *et al.*, 2011; Hachicha *et al.*, 2006). También es común la adición de fuentes de nitrógeno mineral como la urea.

La validez del compostaje de alperujo desde el punto de vista técnico y económico también ha sido demostrada mediante su aplicación a escala industrial (Cayuela *et al.*, 2004; Kobek, 2004) y esta es, cada vez más, la tecnología adoptada para el tratamiento y la revalorización de este residuo. En

España, y en concreto en Andalucía, se ha producido un importante aumento en el número de plantas de compostaje así como de peticiones de estudios de dimensionamiento y viabilidad económica para la construcción de las mismas desde que se iniciara, en 2007 y hasta 2013, el Programa de subvenciones para la mejora de la gestión de los residuos de la molturación de aceituna dentro del Plan de desarrollo rural de Andalucía (<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areas-tematicas/produccion-ecologica/destacados/compostaje.html>). La tendencia de crecimiento se ha consolidado desde finales de 2006, año en el que se realizaba aproximadamente un estudio al mes, hasta el primer trimestre de 2012 en el que se han llegado a realizar una media de siete estudios al mes (Boletín de Compostaje para Producción Ecológica nº 1T-2012). Como consecuencia ha habido un incremento constante en el número de plantas de compostaje de alperujo. La Red Andaluza de Compostaje para la Agricultura Ecológica (RACAE), en el primer trimestre del año 2008, tenía información de 15 plantas de compostaje con una producción total de 17.935 toneladas de compost de alperujo. Los últimos datos correspondientes al tercer trimestre del año 2010 hablan de un total de 55.114 toneladas de compost de alperujo producidas en 45 plantas de compostaje, lo cual refleja el interés que tiene el sector en gestionar, a través del compostaje, los subproductos de su agroindustria. Hay que tener en cuenta que el uso de enmiendas orgánicas se hace especialmente necesario para los productores ecológicos que requieren de aportes para fertilizar sus cultivos. En este sentido, el compost de alperujo es un producto válido, asequible y con bajo coste ambiental para las producciones ecológicas que supone una vía para la diversificación económica de las almazaras y para la viabilidad de la actividad agroindustrial en las zonas rurales Mediterráneas.

3.2 Uso agrícola del alperujo

En la tabla II.4 se presenta una revisión de las experiencias en las que se ha utilizado el alperujo o el compost de alperujo como enmendante orgánico de suelos. Las experiencias en las que se ha utilizado el alperujo como enmendante orgánico de suelos han demostrado su valor agronómico.

Numerosos autores subrayan los efectos positivos en las propiedades físicas, químicas y bioquímicas del suelo relacionados con el alto contenido en materia

Tabla II.4 Resumen de los efectos observados del uso de alperujo y/o compost de alperujo con diferentes fines en agricultura.

Usos	Material	Efectos	Referencias
Fertilizante / Enmendante de suelos	Alperujo	- Inmovilización de N.	Thompson y Nogales, 1999.
		- Retraso en germinación y crecimiento de semillas.	Nastri et al., 2006.
		- Riesgo de aumento de salinidad del suelo.	López-Piñeiro et al., 2011a,b.
		- Posibilidad aumento pérdidas de P disuelto.	López-Piñeiro et al., 2009.
		- Aumento significativo en concentración de P, K disponibles.	López-Piñeiro et al., 2007, 2008.
		- Mejora de las propiedades químicas del suelo.	López-Piñeiro et al., 2007, 2011a,b; Nastri et al., 2006; Tejada y González, 2007.
		- Aumento de la cantidad y actividad de biomasa microbiana.	Saviozzi et al., 2001.
Compost alperujo	Compost alperujo	- Aumento significativo en la estabilidad de los agregados.	López-Piñeiro et al., 2007, 2008; Tejada y González, 2007.
		- Ausencia de efectos fitotóxicos.	Alburquerque et al., 2006a, 2007; Altieri y Esposito, 2008, 2010;
		- Aumento significativo de C _{OT} , C húmico y CCC en suelo.	Altieri et al., 2009; Aviani et al., 2010; Cayuela et al., 2004;
		- Efectos positivos en rendimiento y crecimiento de diferentes cultivos y plantas ornamentales.	Hachicha et al., 2006; Montemurro et al., 2006, 2011; Nogales y Benítez, 2007.
Enmendante en suelos con tratamiento herbicida	Alperujo	- Mejora significativa de las propiedades físicas del suelo. Aumento significativo en la estabilidad de los agregados. Reduce pérdidas de suelo.	Al-Widyan et al., 2005; Nektarios et al., 2011.
		- Aumento del tiempo de permanencia y de la cantidad de herbicida presente en el suelo.	Albarrán et al., 2004; Cabrera et al., 2009; Delgado-Moreno et al., 2007; López-Piñeiro et al., 2011b.
		- Reduce la movilidad vertical de herbicida en suelo. Reduce el riesgo de contaminación de aguas subterráneas.	Cabrera et al., 2010.
		- Riesgo de contaminación de aguas superficiales.	Cabrera et al., 2009; López-Piñeiro et al., 2011.

Usos	Material	Efectos	Referencias
	Compost alperujo	- Potencia la degradación biológica del herbicida.	Delgado-Moreno y Peña, 2007, 2009.
		- Riesgo de contaminación de aguas superficiales.	Cabrera et al., 2009.
		- Dificulta los procesos de difusión. Menor absorción de herbicida en el suelo.	Cabrera et al., 2009; Delgado-Moreno et al., 2007, 2010.
Recuperación de suelos contaminados	Alperujo	- Fitotoxicidad.	de La Fuente et al., 2011.
		- Favorece la biodisponibilidad de Mn.	
	Compost alperujo	- Restauración de las propiedades químicas y microbiológicas del suelo. Mejora de la calidad del suelo.	Alburquerque et al., 2011; de La Fuente et al., 2011; Nogales y Benítez, 2006; Pardo et al., 2011.
		- Reducción de la disponibilidad de Zn y Pb.	Nogales y Benítez, 2006.
Herbicida / Pesticida	Alperujo	- Capacidad abiótica en la supresión de malas hierbas, hongos y nemátodos.	Cayuela et al., 2008a.
	Compost alperujo	- Capacidad abiótica en la supresión de malas hierbas, hongos y nemátodos.	Cayuela et al., 2008a; D'Addabbo et al., 2011; Renco et al., 2007, 2010; Sasanelli et al., 2011.
		- Supresor de enfermedades en plantas por inhibición de patógenos.	Alfano et al., 2011; Aviani et al., 2010; Lima et al., 2008.

C_{OT}: carbono orgánico total; C húmico: carbono de sustancias húmicas; CCC: capacidad de cambio catiónico.

orgánica y nutrientes, especialmente potasio, y con el insignificante contenido en metales pesados del alperujo (López-Piñeiro *et al.*, 2007; Nasini *et al.*, 2013; Natri *et al.*, 2006). Los ensayos en los que se ha aplicado alperujo como enmendante en suelo de olivar en áreas mediterráneas semiáridas han mostrado un aumento significativo en el contenido de carbono orgánico y nitrógeno total del suelo, en la concentración de P y K disponibles, en la capacidad de cambio catiónico y en la estabilidad de los agregados (López-Piñeiro *et al.*, 2008a,b) lo cual se ha relacionado directamente con el correspondiente aumento en el contenido de ácidos húmicos y fúlvicos y carbono orgánico hidrosoluble (López-Piñeiro *et al.*, 2007). Al mismo tiempo se han detectado cambios en las propiedades bioquímicas de estos suelos, en

concreto aumentos en las actividades deshidrogenasa, ureasa, β -glucosidasa, fosfatasa alcalina y arilsulfatasa (López-Piñeiro *et al.*, 2011a). En estos ensayos los análisis foliares muestran incrementos significativos en las concentraciones de N, P y K en la hoja de olivo y se han observado incrementos generales en la producción de oliva tras cinco y diez años de sucesivas aplicaciones de alperujo como enmendante (López-Piñeiro *et al.*, 2008a, 2011a, respectivamente). Nasini *et al.* (2013) encontraron una actividad vegetativa superior (conjunto de parámetros como longitud de los brotes, volumen del follaje y peso de los restos de poda), mayor rendimiento en la producción de aceituna y frutos con mayor peso seco, en olivos tratados con alperujo como enmendante durante cuatro años, respecto al tratamiento control.

Sin embargo, algunas experiencias también han demostrado que el alperujo, aunque presenta menor fitotoxicidad que el alpechín, provoca grandes desequilibrios nutricionales al modificar la dinámica del nitrógeno en el suelo debido a su elevada relación carbono/nitrógeno (Thompson y Nogales, 1999; Saviozzi *et al.*, 2001) y se ha advertido del riesgo de un aumento en la salinidad del suelo en el uso a largo plazo del alperujo con dosis superiores a 30 Mg ha⁻¹ (López-Piñeiro *et al.*, 2011a). Por ello, la opción de compostarlo con otros residuos agrícolas antes de su aplicación al suelo es un método efectivo de reciclaje, de bajo coste, que garantiza la calidad del compost obtenido al final de la transformación biológica debido, entre otras características, al alto contenido en MO y a la ausencia de sustancias tóxicas recalcitrantes en el compost de alperujo.

Son numerosos los trabajos científicos que recomiendan el compostaje de este residuo como estrategia sostenible para su reciclaje con fines agrícolas (Cayuela *et al.*, 2008b; Chandra y Sathiavelu, 2009; Filippi *et al.*, 2002). El compost de alperujo se ha ensayado con éxito como enmendante orgánico en el propio olivar (Altieri y Esposito, 2008; Cayuela *et al.*, 2004; López-Piñeiro *et al.*, 2007) y en diferentes cultivos: gramíneas (*Lolium perenne* L.) (Albuquerque *et al.*, 2007), trigo (López-Piñeiro *et al.*, 2008b), pimiento

(Alburquerque *et al.*, 2006a), lechuga y tomate (Altieri y Esposito, 2010; Walker and Bernal, 2008), patata (Hachicha *et al.*, 2006), entre otros.

De la bibliografía examinada, en todos los casos en los que se ha realizado la aplicación continuada de compost de alperujo en suelo de olivar (entre 7-9 ton ha⁻¹) se obtuvieron resultados similares a los derivados de una fertilización mineral estándar como urea. En ningún caso se produjeron efectos negativos en el árbol ni se vio mermado el rendimiento de la plantación, todo lo contrario, su uso continuado mejoró la calidad del carbono orgánico del suelo ya que aumentó de forma significativa el carbono húmico tras tres y cinco años de aplicación. En el resto de cultivos, los rendimientos alcanzados también demostraron la efectividad de su uso como sustitución de la fertilización mineral. En general, debido al aumento producido en el contenido de carbono orgánico total, carbono orgánico hidrosoluble y carbono total extraíble, se recomienda su uso en los suelos del área mediterránea muy degradados tras décadas de producción agrícola, pobres en MO y susceptibles de mineralización remarcando, en estos casos, que la mejora que produce en las propiedades físicas y químicas del suelo supera en importancia su uso como fertilizante.

Su aplicación como enmienda orgánica en técnicas de remediación de suelos contaminados con metales pesados también es considerada por numerosos autores como una alternativa efectiva y realista a su uso agrícola tras los resultados de numerosas experiencias en las que se consiguen restaurar las propiedades químicas y microbiológicas de los suelos, mejorando su fertilidad y calidad (de la Fuente *et al.*, 2011; Nogales y Benítez, 2006; Pardo *et al.*, 2011). También se ha estudiado el impacto de las enmiendas de alperujo en la dinámica de adsorción-desorción, degradación, lixiviado y persistencia de diferentes herbicidas en suelos de olivar y otros (Cabrera *et al.*, 2010; Delgado-Moreno *et al.*, 2007; López-Piñeiro *et al.*, 2011b) y se ha ensayado con éxito como supresor de patógenos del suelo en diferentes cultivos (Lima *et al.*, 2008; Renco *et al.*, 2010; Sasanelli *et al.*, 2011), pesticida (Cayuela *et al.*, 2008a) y fertilizante foliar (Tejada y González, 2004).

El progreso técnico y los conocimientos científicos han llevado a una reciente modificación en la normativa de fertilizantes, en concreto del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes, con el fin de adecuar la misma a la realidad práctica de la agricultura. De acuerdo a la nueva normativa (Orden PRE/630/2011, de 23 de marzo, por la que se modifica el RD 824/05 sobre productos fertilizantes), se incluyen el alperujo y el compost de alperujo como fertilizantes regulados dentro del Grupo de Enmiendas Orgánicas (Grupo 6) (tabla II.5). En este grupo se pueden destacar los denominados como “Enmienda orgánica compost”, categoría que incluye a los compost producidos con mezcla de restos orgánicos vegetales y estiércoles, entre otros; “Enmienda orgánica compost vegetal”, que incluye a los compost producidos solamente con restos vegetales; “Enmienda orgánica compost de estiércol”, si sólo se han utilizado estiércoles; y “Enmienda orgánica vermicompost”. En la modificación actual se incorporan las denominaciones “Alperujo desecado” y “Compost de alperujo”. La tabla II.5 muestra los requisitos que la legislación (Orden PRE/630/2011) exige al alperujo y a los compost de alperujo así como la definición que da de los mismos.

II.4. Impacto ambiental del uso agrícola del alperujo

El aporte de MO tiene un efecto muy beneficioso para mantener y mejorar los niveles de carbono orgánico en el suelo. La MO es uno de los componentes más importantes del suelo por su influencia sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo que afectan de forma directa a sus funciones agronómicas y medioambientales (Reeves *et al.*, 1997).

La función agronómica del alperujo se ha visto con anterioridad al tratar su uso agrícola como enmienda orgánica. La función medioambiental está centrada en el secuestro de carbono en suelos enmendados para contrarrestar las emisiones de CO₂ y evitar los problemas asociados a la pérdida de carbono en suelos agrícolas (Lal, 2004a, 2006).

Tabla II.5 Extracto de la tabla correspondiente al Grupo 6 (“Enmiendas orgánicas”) del Anexo I (“Relación de tipos de productos fertilizantes”) de la Orden PRE/630/2011, por la que se modifica el RD 824/05 sobre productos fertilizantes. En este extracto se muestran los requisitos que la legislación exige al alperujo y a los compost de alperujo, así como la definición que se da de los mismos.

Nº	Denominación del tipo	Informaciones sobre la forma de obtención y los componentes esenciales	Contenido mínimo en nutrientes (porcentaje en masa). Información sobre la evaluación de los nutrientes. Otros requisitos	Otras informaciones sobre la denominación del tipo o del etiquetado	Contenido en nutrientes que debe declararse y garantizarse. Formas y solubilidad de los nutrientes. Otros criterios
1	2	3	4	5	6
08	Alperujo desecado	Producto procedente de almazaras con un proceso posterior de secado para reducir su fitotoxicidad.	<ul style="list-style-type: none"> – Materia orgánica total: 25% – Humedad máxima: 25% – Contenido máximo en polifenoles: 0,8% – No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos. 	<ul style="list-style-type: none"> – pH – Conductividad eléctrica – Relación C/N – Humedad mínima y máxima – Tratamiento o proceso de elaboración, según la descripción indicada en la columna 3. 	<ul style="list-style-type: none"> – Materia orgánica total – C orgánico – N total y orgánico (si superan el 1%) – Otras formas de N (si superan el 1%) – P₂O₅ total (si supera el 1%) – K₂O total (si supera el 1%) – Ácidos húmicos – Granulometría
09	Compost de alperujo	Producto obtenido por descomposición biológica y estabilización de la materia orgánica procedente del alperujo, bajo condiciones que permitan un desarrollo de temperaturas termofílicas.	<ul style="list-style-type: none"> – Materia orgánica total: 45% – Humedad máxima: 40% – Relación C/N < 20 – Contenido máximo en polifenoles: 0,8% – No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos. 	<ul style="list-style-type: none"> – pH – Conductividad eléctrica – Relación C/N – Humedad mínima y máxima – Tratamiento o proceso de elaboración, según la descripción indicada en la columna 3. 	<ul style="list-style-type: none"> – Materia orgánica total – C orgánico – N total y orgánico (si superan el 1%) – Otras formas de N (si superan el 1%) – P₂O₅ total (si supera el 1%) – K₂O total (si supera el 1%) – Ácidos húmicos – Granulometría

Hay que tener en cuenta que los beneficios netos del compostaje de residuos orgánicos sobre el secuestro de carbono pueden verse contrarrestados por la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) como el N_2O y el CH_4 durante el proceso, ya que estos gases tienen un potencial de calentamiento global superior al del CO_2 (IPCC, 2006). La transformación del alperujo mediante compostaje da lugar a la formación de estos gases, que nunca han sido evaluados.

Respecto al alperujo hay una falta de conocimiento sobre el impacto ambiental asociado a su compostaje, principalmente en cuanto a estos dos factores medioambientales importantes, citados anteriormente: las emisiones de GEI y el efecto del compost en la estructura del suelo, en concreto, su potencial para favorecer el secuestro de carbono.

4.1 Ciclo de carbono de los suelos agrícolas.

La figura II.6 muestra los principales depósitos entre los que tiene lugar de forma activa el ciclo del carbono. De todos ellos, el ciclo terrestre, que se desarrolla principalmente entre el suelo y la biomasa, representa el mayor sumidero (3.120 Pg de C). Cuadruplica el sumidero atmosférico y la reserva de carbono del suelo triplica la atmosférica. Con estas proporciones, y teniendo en cuenta que el tiempo de permanencia del carbono en el ecosistema terrestre es mayor que en la atmósfera, en la bibliografía se ha discutido ampliamente sobre la estrategia del secuestro de carbono: la posibilidad de transferir al suelo, de forma permanente o a largo plazo, una parte del carbono atmosférico para afrontar parte de las emisiones de GEI (Freibauer *et al.*, 2004; Lal, 2008; Smith, 2008) teniendo en cuenta que pequeños cambios en la magnitud de la respiración del suelo tendrían un gran efecto sobre la concentración de CO_2 en la atmósfera (Schlesinger y Andrews, 2000).

Las estimaciones sobre el potencial que tienen las tierras de cultivo para incrementar la cantidad de carbono varían en la bibliografía. El último informe del IPCC (Smith *et al.*, 2007) estima un potencial de secuestro de 1,4-2,9 Gt de CO_2 -equivalente al año, en el conjunto global de suelos agrícolas, llegando el

suelo a la saturación de carbono tras 50-100 años. Sin embargo, Chatterjee y Lal (2009) sugieren un potencial de secuestro de los suelos agrícolas de hasta 6 Gt de CO₂-equivalente al año, hasta 2030. En Europa, la velocidad de almacenamiento de carbono en suelos enmendados se ha estimado en 0,4 t C ha⁻¹ año⁻¹ (Freibauer *et al.*, 2004), teniendo en cuenta que el incremento disminuye necesariamente con el tiempo al alcanzar un nuevo equilibrio (Powlson *et al.*, 2012). Mondini *et al.* (2012) calculan que la aplicación de compost a todas las tierras agrícolas en Italia resultaría en una velocidad anual de fijación de carbono de 0,023 Mt C año⁻¹.

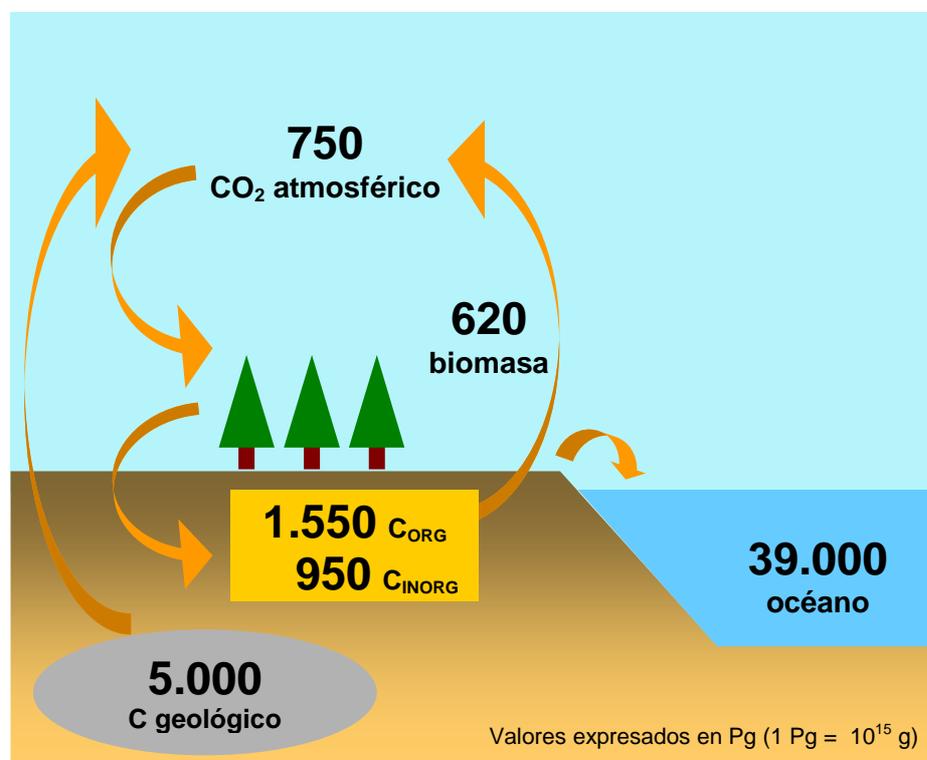


Figura II.6 Ciclo terrestre del carbono: (1) océano: almacena unos 39.000 Pg de C, excepto unos 1000 Pg, el resto se encuentra en las capas más profundas y no circula de forma activa; (2) sumidero geológico: unos 5000 Pg (4000 Pg de carbón, 500 Pg de petróleo y 500 Pg de gas natural); (3) carbono del suelo: 1550 Pg de C orgánico y 950 Pg de C inorgánico, a un metro de profundidad; (4) atmósfera: contiene unos 750 Pg de C-CO₂, cantidad que aumenta anualmente a un ritmo que en la actualidad supera los 3 Pg C año⁻¹ (IPCC, 2001); y (5) biomasa: contiene unos 620 Pg incluyendo los restos vegetales y animales en descomposición. (Adaptado de Janzen, 2004).

4.1.1 Importancia de las enmiendas orgánicas en la fijación de C en suelos agrícolas.

En las últimas décadas, se ha registrado a nivel mundial una gran pérdida de carbono orgánico en los suelos de cultivo relacionada con la intensificación de las prácticas agrícolas que está produciendo graves consecuencias: suelos menos fértiles y todo un conjunto de procesos de degradación del suelo tales como erosión, desertificación, compactación y déficit de nutrientes (Lal, 2004b, 2006).

En Europa se ha estimado que el 45% de los suelos contienen menos de un 2% de carbono orgánico, nivel que es considerado crítico (Loveland and Webb, 2003), y que un 16% del territorio cultivado es vulnerable a la desertización (Holland, 2004), si bien este porcentaje puede ser superior en las zonas mediterráneas debido a la existencia de suelos con niveles de carbono orgánico inferiores al 1% y a las condiciones agro-climáticas límite (climas secos y semiáridos). En España, los bajos niveles de carbono orgánico registrados en suelos de clima mediterráneo y sobretodo, semiárido, los sitúa a menudo por debajo de los valores propuestos como umbrales de degradación (Romanyà *et al.*, 2007). En estos suelos, la dinámica de mineralización del carbono orgánico es muy acelerada y hay poca humificación. Como consecuencia, las propiedades relacionadas con la riqueza de sustancias húmicas (estructura y estabilidad) se encuentran mermadas.

Sin embargo, estos suelos tienen una capacidad destacable de estabilizar carbono al encontrarse por debajo del máximo de protección de MO. Estos niveles de MO tan bajos deben considerarse como un factor clave para la conservación del suelo a través de prácticas agrícolas que restauren, mantengan y, a ser posible, aumenten la reserva de carbono orgánico del suelo. Según Smith (2004b), la mejora del manejo del suelo agrícola juega un papel significativo en la adaptación y mitigación del cambio climático.

Entre los mecanismos propuestos para restaurar los niveles de carbono, el uso de enmiendas orgánicas se considera uno de los más efectivos (Lal,

2004a) ya que se consigue aumentar el aporte de MO al tiempo que se reducen las pérdidas al mejorar las propiedades del suelo (figura II.7).

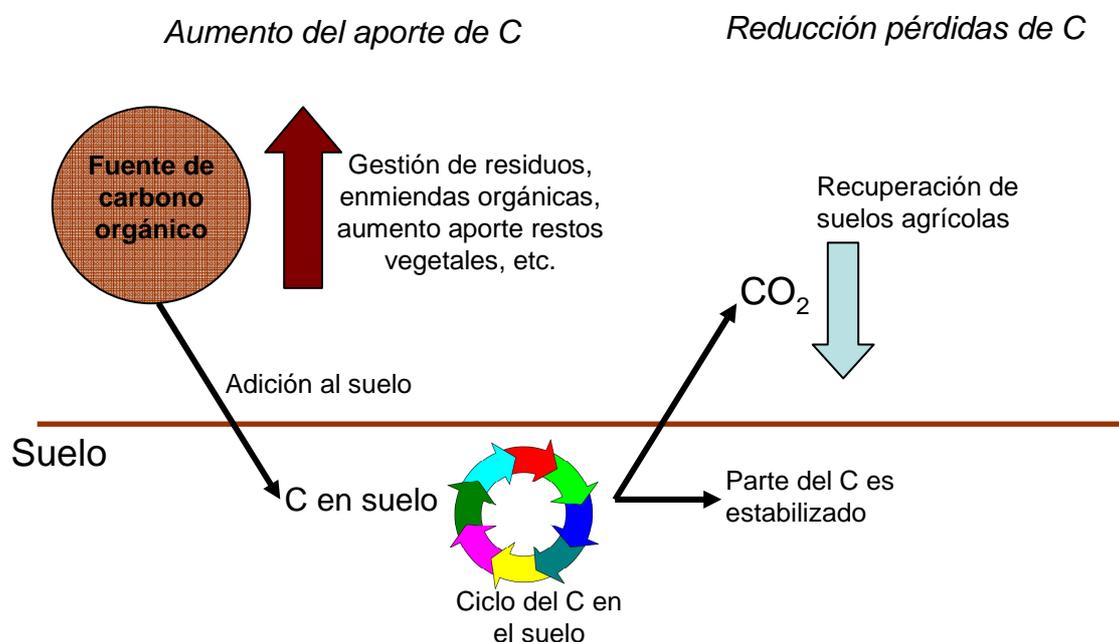


Figura II.7 El almacenamiento de carbono en los suelos puede potenciarse de dos maneras: aumentando los aportes y/o reduciendo las pérdidas. (Adaptado de Smith, 2008).

Es de especial interés el empleo de enmiendas ricas en lignocelulosa, ya que la lignina es una de las principales fuentes de carbono estable en el suelo (Trigo y Ball, 1994). En concreto, la aplicación de compost se ha sugerido como una forma natural de estabilizar carbono en el suelo (Powlson *et al.*, 2012). El mayor interés del compostaje se centra en la capacidad de estabilizar la MO mediante procesos de humificación, logrando evitar o reducir la posterior degradación del carbono a CO₂, lo que tiene una fuerte implicación en el uso agrícola de los compost y la incorporación de éstos a la MO del suelo, donde podría permanecer durante largos periodos de tiempo representando un importante depósito de carbono (Lal, 2003).

Así, el uso de compost de alperujo en la agricultura puede presentar otras ventajas desde el punto de vista medioambiental asociadas al secuestro de carbono y la mitigación del cambio climático. Sánchez-Monedero *et al.*

(2008) sugirieron que el empleo de compost de alperujo como fuente de carbono podría aumentar la cantidad de carbono estabilizado en el suelo durante más tiempo debido a la baja velocidad de degradación del residuo registrada tanto durante su compostaje como tras su aplicación al suelo. Este comportamiento también fue observado por Cayuela (2004) en suelo de olivar enmendado con compost de alperujo en el que se calculó una degradación media de un tercio de la MO añadida tras el primer año, mientras que la descomposición típica de la MO en el suelo tras un año de permanencia representa normalmente unos dos tercios de la MO añadida (Jenkinson, 1981).

Las consecuencias climáticas de los países que han sido incapaces de reducir sus emisiones netas de GEI en la medida y en el marco de tiempo requeridos por el Protocolo de Kyoto (UNFCCC, 1997), hace que se estén potenciando cada vez más estrategias en las que el suelo es parte de la solución del cambio climático. Entre ellas, ha aumentado la posibilidad de que la fijación de carbono en los suelos agrícolas pueda incluirse en las existencias nacionales de carbono, opción ya reconocida en el Protocolo de Kyoto en sus artículos 3.3 y 3.4 como medida para la compensación de las emisiones de GEI y que se recoge detalladamente en el informe *Uso de los suelos, cambio en el uso de los suelos y forestación* (IPCC, 2003).

Al margen de estas políticas, la inmovilización de carbono orgánico se debe considerar como un beneficio añadido, asociado al uso sostenible de los recursos naturales como el suelo y la MO, teniendo importantes aplicaciones en zonas agrícolas con problemas de degradación de suelos en las que se puede conseguir una mejora en la estructura de los mismos, el mantenimiento de la fertilidad y la prevención de los procesos de erosión (Lal, 2003).

4.1.2 Mecanismos de fijación de carbono en el suelo.

En la figura II.8 se muestran los principales procesos que intervienen en la inmovilización de carbono en el suelo entre los que destacan la humificación y la agregación.

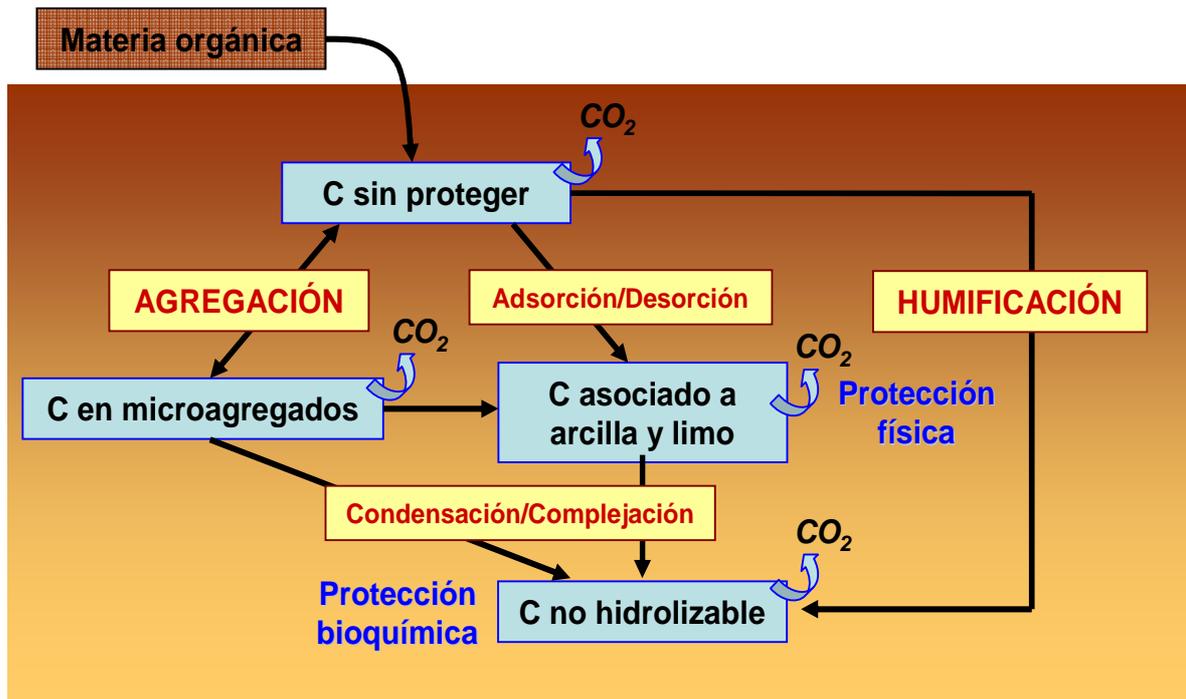


Figura II.8 Dinámica de la MO en el suelo y principales mecanismos de inmovilización del C orgánico. (Adaptado de Six *et al.*, 2002).

a) Humificación

Las teorías clásicas sobre la humificación proponen que las sustancias húmicas derivan de la lignina y sugieren diferentes mecanismos para su formación, en los que intervienen polifenoles procedentes del ataque microbiano a la lignina o bien a la celulosa y hemicelulosas (Stevenson, 1994). Los polifenoles se oxidan a quinonas las cuales polimerizan, en presencia o no de compuestos aminados, para dar lugar a las sustancias húmicas. Una teoría posterior plantea la formación de sustancias húmicas a partir de monosacáridos formados como subproductos de la actividad microbiana, que darían lugar a polímeros nitrogenados incorporados al humus. Además del nitrógeno, el fósforo, el azufre y algunos micronutrientes también son de gran importancia en la humificación. Así, la conversión del carbono de la biomasa en humus depende de la calidad de la misma (relación C/N, contenido en lignina y compuestos fenólicos), de las propiedades del suelo (cantidad y composición mineralógica de las arcillas, textura, capacidad de retención de agua), y del clima (temperatura media anual, cantidad y distribución de las precipitaciones).

b) Agregación

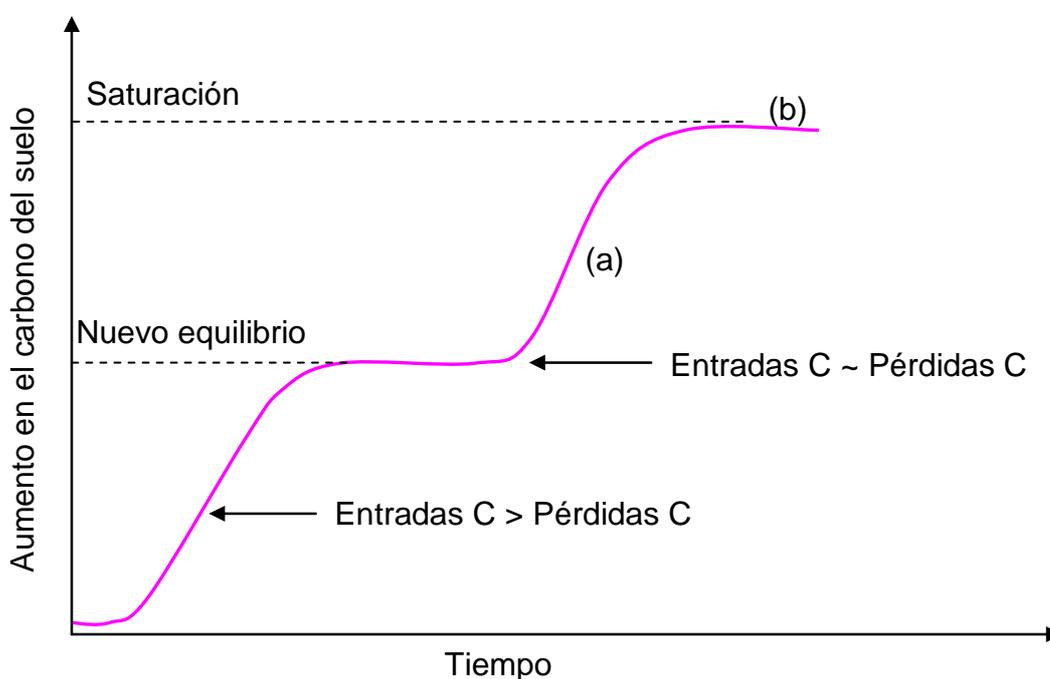
La agregación implica la formación de complejos organominerales y de micro-agregados en los que el carbono queda ocluido y físicamente protegido de la actividad de los microorganismos del suelo. La inmovilización de carbono orgánico en el suelo tiene lugar especialmente gracias a la formación de estos micro-agregados (Blanco-Canqui y Lal, 2004; Kuzyakov, 2006). Las raíces de las plantas y los residuos vegetales constituyen el esqueleto orgánico primario que envuelve a las partículas del suelo y forma agregados. Los procesos microbianos de descomposición de los residuos orgánicos son responsables de la generación de compuestos orgánicos que actúan como “agentes de pegado” en la agregación. La acción de estos microorganismos define la permanencia, la movilidad y la formación de los agregados.

c) Otros mecanismos

La transferencia del carbono orgánico desde la superficie hacia el subsuelo (por debajo de los 30 cm de profundidad) es otro de los mecanismos que protege al carbono de la mineralización. La calcificación implica la formación de carbonatos secundarios y la filtración de bicarbonatos en el agua del suelo desde la superficie. Los carbonatos secundarios se forman por disolución del CO₂ que se encuentra en el suelo procedente de la respiración de las raíces o de la respiración de los microorganismos al descomponer la MO del suelo (Lal y Kimble, 2000). Este proceso transcurre de forma muy lenta (la velocidad anual varía entre 5-15 kg C ha⁻¹) (Lal, 2003) por lo que es importante a largo plazo en la disminución del CO₂ atmosférico como mecanismo de captura del carbono inorgánico del suelo (Lal, 2003).

Por último, en la estrategia del secuestro de carbono hay que considerar varias cuestiones relacionadas con el potencial que tendrá un suelo para almacenar carbono.

En primer lugar, es importante conocer el nivel de saturación del suelo (nivel a partir del cual no acumula más carbono) para determinar cuánto carbono podrá estabilizar, con qué velocidad lo hará y por cuánto tiempo (figura II.9). Como se exponía con anterioridad, los suelos más degradados, cuyo nivel de carbono esté más alejado de su nivel de saturación, serán aquellos en los que la inmovilización de carbono sea más eficaz (Stewart *et al.*, 2007). Las mayores ganancias en términos de secuestro de carbono se obtienen en las primeras adiciones de MO, disminuyendo su efecto según se acerca el nivel de saturación (West y Six, 2007).



- (a) Nuevos aportes de C dan lugar a un aumento adicional del C en el suelo.
- (b) Nuevos aportes de C no producen un aumento adicional del C en el suelo.

Figura II.9 Dinámica del C en el suelo tras la adopción de prácticas enfocadas al secuestro de C que pueden modificar la capacidad de C del suelo. Las variables medioambientales particulares (temperatura, precipitaciones, propiedades físicas y químicas del suelo) influirán en que los cambios sean más o menos acentuados. (Adaptado de West y Six, 2007).

En segundo lugar, hay que tener en cuenta que la cantidad de carbono almacenado por medio de buenas prácticas de manejo de los suelos agrícolas es reversible y no permanente a no ser que los agricultores continúen utilizando la práctica que conduce a la captura de carbono (Dumanski, 2004;

Powlson *et al.*, 2011). Las prácticas agrícolas que persigan la inmovilización de carbono deben aumentar los aportes de MO en el suelo y reducir la mineralización y las pérdidas de carbono por erosión (figura II.7).

4.2 Emisiones de GEI asociadas al compostaje

Aunque uno de los principales intereses del compostaje es su potencial en la reducción de emisiones de GEI (Zeman *et al.*, 2002), el proceso de compostaje puede dar lugar a la formación de estos gases, principalmente metano y óxido nitroso. Como consecuencia, existe un creciente interés en el estudio de las emisiones de estos gases durante el proceso de compostaje debido a su potencial de calentamiento global (IPCC, 2006), y en encontrar los parámetros operacionales óptimos que permitan minimizar su formación (Hellmann *et al.*, 1997; Beck-Friis *et al.*, 2001).

Las características de los materiales de partida afectan a las propiedades físico-químicas de la pila y como consecuencia gobiernan los procesos que conducen a la formación, difusión y transporte de los GEI en el interior de la pila. Otras variables que afectan a la emisión de estos gases son la humedad y la porosidad del material, por su efecto sobre la disponibilidad de oxígeno y la difusión del gas, y la presencia de nutrientes y compuestos orgánicos, utilizados por los microorganismos como fuente de energía. Además, la tecnología utilizada para la aireación (aireación forzada vs. volteos), el tamaño de las pilas y la temperatura de las mismas también son factores clave en la generación y emisión de GEI. A continuación se discute el efecto de estas variables en la emisión de los principales GEI generados durante el compostaje.

4.2.1 Dióxido de carbono (CO₂)

Las emisiones de CO₂ en el compostaje tienen su origen principal en los procesos de degradación biológica de la MO, fundamentalmente como consecuencia de la descomposición aeróbica y en menor medida derivadas de los procesos anaeróbicos o de la oxidación del CH₄ por bacterias aerobias

metanotróficas. Dado que entre un 40-70% de la MO original puede ser degradada durante el compostaje (Haug, 1993), este CO₂ biogénico es el gas producido en mayor cantidad durante el proceso. Sin embargo, el potencial de calentamiento global de estas emisiones no se tiene en cuenta al evaluar el impacto medioambiental de las operaciones de compostaje ya que el C-CO₂ de origen biológico es considerado carbono neutro (IPCC, 2006). Las emisiones de este gas son de interés para establecer balances de masa de los procesos de compostaje (Boldrin *et al.*, 2009), como medida de la actividad microbiana global de la pila que permite seguir el progreso del proceso (Hobson *et al.*, 2005) y para evaluar el grado de estabilidad del producto final (Barrena *et al.*, 2006).

La segunda fuente de CO₂ son las emisiones asociadas al consumo de energía y combustible en las instalaciones de compostaje. Estas dependen del nivel tecnológico de la planta y de la maquinaria utilizada (cargadores frontales, equipo para los volteos, trituradoras, filtros, y otras actividades de procesado).

4.2.2 Metano (CH₄)

El metano es producido en zonas con concentraciones bajas de oxígeno, que si bien raramente se dan durante un proceso de compostaje bien controlado, sí que pueden ocurrir en el interior de las pilas en las fases iniciales del proceso cuando grandes cantidades de nutrientes y compuestos orgánicos fácilmente disponibles estimulan el crecimiento microbiano reduciendo los niveles de oxígeno en la pila.

La degradación anaerobia de la MO implica la hidrólisis y fermentación de una amplia gama de moléculas orgánicas complejas, como las proteínas, polisacáridos o grasas, que se transforman en compuestos orgánicos sencillos de bajo peso molecular como son el acetato, propionato, lactato, metanol, etanol, etc., que pueden ser utilizados como sustratos por bacterias metanogénicas. Las condiciones óptimas para el crecimiento de bacterias metanogénicas son la falta de oxígeno (microorganismos estrictamente anaerobios), un potencial redox inferior a -200 mV, pH neutro y la presencia de

nutrientes y sustratos ricos en MO (Kebreab *et al.*, 2006). Como consecuencia, la mayoría de las emisiones de CH₄ se registran durante las primeras semanas del proceso, al inicio de la fase termófila (Beck-Friis *et al.*, 2000). Las temperaturas tan elevadas que se alcanzan al inicio del proceso disminuyen la solubilidad del oxígeno (Pel *et al.*, 1997) facilitando la creación de puntos anaerobios en el interior de la pila.

La emisión de CH₄ en las pilas de compostaje depende, no sólo de la actividad biológica de la pila, sino de otros factores que afectan al transporte del gas desde los puntos anaerobios hacia la superficie, como son la difusión del gas en el interior de la pila y la presencia de bacterias metanotróficas. Los metanótrofos son microorganismos aerobios que colonizan los alrededores de las zonas anaerobias y la superficie de la pila y que son capaces de oxidar entre el 46 y el 98% del CH₄ generado en la misma (Jäckel *et al.*, 2005).

Los factores principales que gobiernan las emisiones de CH₄ durante el proceso son los materiales de partida, la altura y forma de la pila y el control de la humedad y la frecuencia de volteo (Kebreab *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2008). Estas variables afectarán tanto a la disponibilidad de oxígeno como a su difusión en la pila de compostaje. En cuanto a los materiales de partida, aquellos caracterizados por una elevada humedad, por encima de los niveles máximos recomendados por Haug (1993) para el compostaje, como lodos, estiércoles o residuos de comida, pueden producir emisiones importantes de CH₄, mientras que los residuos con gran capacidad de retención de agua como los materiales lignocelulósicos emiten niveles muy bajos de este gas, si es que producen alguno (Cayuela *et al.*, 2012). La tabla II.6 muestra un resumen de las cantidades de CH₄ y N₂O generadas durante el compostaje de una amplia gama de residuos orgánicos. Las cantidades de CH₄ emitidas durante el compostaje de estiércoles están comprendidas entre 0,1 y 8,3 kg de CH₄ por tonelada tratada, rango que se ve afectado por el tratamiento que haya recibido el estiércol anterior a su compostaje y también por el sistema de aireación utilizado, volteos vs aireación forzada.

Tabla II.6 Resumen de las emisiones de CH₄ y N₂O registradas en la bibliografía para diferentes tipos de residuos y sistemas de compostaje.

Material de partida	Sistema	N ₂ O	CH ₄	Referencia
Estiércoles				
Ganado porcino	volteos	0,1-0,5 % N inicial	0,5 % MO inicial	Kuroda et al., 1996; Szanto et al., 2007.
	estático	3,0-9,8 % N inicial 0,058 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	12,6 % MO inicial 0,2-1,9 kg C-CH ₄ ton ⁻¹	Szanto et al., 2007; Fukumoto e Inubushi, 2009. Fukumoto et al., 2003; Sommer y Moller, 2000.
Ganado vacuno	volteos	0,070-0,320 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	8,1-8,9 kg C-CH ₄ ton ⁻¹	El Kader et al., 2007; Hao et al., 2001; Hao et al., 2004 ; Czepiel et al., 1996.
	estático	0,046-0,370 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	0,1-6,3 kg C-CH ₄ ton ⁻¹	El Kader et al., 2007; Pattey et al., 2005; Hao et al., 2001.
Gallinaza		0,091 kg N-N ₂ O ton ⁻¹		El Kader et al., 2007.
Residuos sólidos urbanos (RSU)				
RSU	volteos	261 mg N-N ₂ O m ⁻² d ⁻¹	35 g CH ₄ m ⁻² d ⁻¹	Beck-Friis et al., 2000.
	estático	0-0,240 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	4,5-9,0 kg C-CH ₄ ton ⁻¹	Clemens y Cuhls, 2003.
Fracción orgánica RSU	volteos	0,048-0,160 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	1,3-3,3 kg C-CH ₄ ton ⁻¹	Colón et al., 2012.
	estático	0,048 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	0,3 kg C-CH ₄ ton ⁻¹	Colón et al., 2012.
Residuos comida	estático	1,360 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	--	He et al., 2000.
Otros residuos				
Lodos depuradora	estático	0,320 kg N-N ₂ O ton ⁻¹	--	Czepiel et al., 1996.
Harinas cárnicas	volteos	0,07-0,11 % del N inicial	--	Cayuela et al., 2012.
IPCC (2006): Factores de emisión de referencia para CH₄ y N₂O en el compostaje de residuos				
En peso seco		0,6 g (0,2-1,6) N ₂ O por kg de residuo tratado	10 g (0,08-20) CH ₄ por kg de residuo tratado	IPCC, 2006.
En peso húmedo		0,3 g (0,06-0,6) N ₂ O por kg de residuo tratado	4 g (0,03-8) CH ₄ por kg de residuo tratado	

4.2.3 Óxido Nitroso (N₂O)

A pesar de que las cantidades de N₂O que se producen durante un proceso de compostaje son relativamente pequeñas, la contribución de este gas al balance global de N₂O en la gestión de residuos debe ser tomada en cuenta debido al impacto de la utilización de estiércoles u otros residuos

orgánicos ricos en nitrógeno en las operaciones de compostaje (de Klein y Eckard, 2008).

La producción biológica de N_2O durante el compostaje es un proceso complejo debido principalmente a que son varios los mecanismos implicados en la formación de este gas (nitrificación, desnitrificación nitrificante y desnitrificación), que a su vez pueden actuar de forma simultánea en diferentes puntos del interior de la pila (Czepiel *et al.*, 1996; Kebreab *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2011).

La nitrificación es uno de los mecanismos principales que conduce a la emisión de N_2O durante el compostaje (figura II.10). El ión amonio (NH_4^+) es el principal precursor de la nitrificación. Este se genera como producto principal de la descomposición de la MO nitrogenada (amonificación) al inicio del proceso de compostaje (Sánchez-Monedero *et al.*, 2001) pero los valores alcalinos de pH típicos de las pilas de compostaje favorecen la transformación del NH_4^+ soluble en NH_3 , el cual es posteriormente oxidado. La oxidación biológica del amoníaco a nitrato ocurre en dos etapas secuenciales: la transformación inicial de amoníaco a nitrito realizada por diferentes géneros de bacterias amonio-oxidantes (AOB), como las *Nitrosomonas* y *Nitrosospiras*; y la oxidación de nitrito a nitrato efectuada por bacterias nitrito-oxidantes (NOB), como las del género *Nitrobacter* (Kowalchuk *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2010).

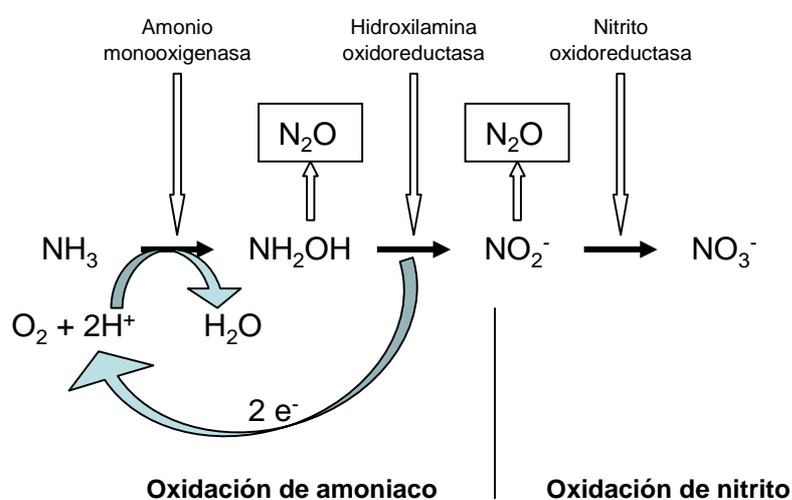


Figura II.10 Nitrificación: esquema del mecanismo y de las enzimas implicadas (adaptado de Wrage *et al.*, 2001).

Recientemente se ha sugerido que las bacterias del género *Archaea* amonio-oxidantes (AOA) están también implicadas en la nitrificación en las pilas de compostaje, aunque su contribución al total de las emisiones de N_2O aún no está clara (Yamamoto *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2012). Todas estas bacterias son aerobias y autótrofas y obtienen la energía para la fijación del CO_2 de la nitrificación (Wrage *et al.*, 2001).

La desnitrificación es la reducción gradual de NO_3^- a N_2 llevada a cabo por microorganismos desnitrificantes, bacterias predominantemente heterótrofas y anaerobias facultativas capaces de utilizar el NO_3^- en lugar del oxígeno como aceptor de electrones en la respiración en condiciones anaerobias. Durante el proceso se producen distintos compuestos intermedios que pueden ser liberados al medio (figura II.11). Al contrario que en la nitrificación, el N_2O es un intermedio más en la desnitrificación, razón por la cual este mecanismo representa la principal fuente de producción de este gas en determinados materiales como los estiércoles (Kebreab *et al.*, 2006).

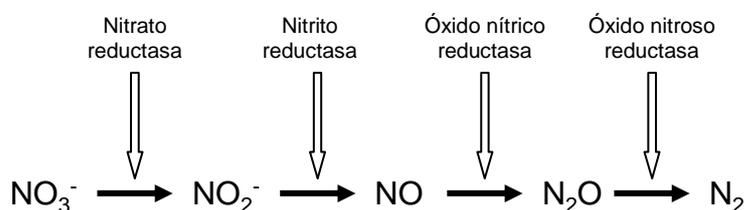


Figura II.11 Desnitrificación: esquema del mecanismo y de las enzimas implicadas (adaptado de Wrage *et al.*, 2001).

En ausencia de oxígeno, el NO_3^- se reduce a N_2 sin formación apreciable de N_2O . Sin embargo, en condiciones en las que la concentración de oxígeno es limitada, la relación N_2O/N_2 aumenta debido a que la inhibición que causa el oxígeno sobre la N_2O -reductasa es más fuerte que sobre el resto de reductasas de la desnitrificación (figura II.11) (Wrage *et al.*, 2001). En estas condiciones de poca disponibilidad de oxígeno, el NO_2^- no completaría su oxidación a NO_3^- en la nitrificación (figura II.10) sino que se vería favorecida su reducción a N_2O a través de un mecanismo de nitrificación-desnitrificante: una desnitrificación acoplada a una nitrificación incompleta. Esta secuencia de

lo largo de toda la pila (Beck-Friis *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2001). De este modo, los organismos desnitrificantes colonizarían el interior de la pila mientras que los nitrificantes, que necesitan concentraciones de oxígeno entre un 1 y un 10% (Béline *et al.*, 1999), colonizarían la superficie aeróbica de la misma. La contribución de cada organismo a las emisiones de N₂O también dependerá de la humedad de la pila (Hwang y Hanaki, 2000), de la disponibilidad de nitrógeno en la MO y de la difusión del gas en el interior de la pila, como ocurría con el CH₄ (Hao *et al.*, 2001). Varios autores han observado picos en la emisión de N₂O al inicio del proceso de compostaje y después de la fase termófila, cuando la temperatura disminuye y favorece el crecimiento de las bacterias nitrificantes (He *et al.*, 2001; Kebreab *et al.*, 2006). El intercambio de gases en el interior de la pila es otro factor importante en la generación de N₂O ya que, como se mencionaba con anterioridad, la formación de este gas por los organismos nitrificantes y desnitrificantes aumenta a bajas concentraciones de O₂.

En la tabla II.6 se recogen las cantidades de N₂O generadas durante el compostaje de una amplia gama de residuos orgánicos. Las emisiones de este gas derivadas del compostaje de estiércoles (materiales ricos en nitrógeno y caracterizados por una elevada humedad) varían desde 0,046 hasta 0,370 kg de N-N₂O por tonelada tratada, dependiendo del sistema de compostaje. Las pilas estáticas con aireación forzada aumentan las emisiones de N₂O al prevenir las pérdidas de amoníaco, el cual puede ser oxidado a nitrato generando N₂O (Figura 1.11). La emisión de N-N₂O en el compostaje de estiércoles puede suponer hasta casi el 10% del N inicial (Szanto *et al.*, 2007).

II.5. Bibliografía

- Ait Baddi, G., Cegarra, J., Merlina, G., Revel, J.C., Hafidi, M. 2009. Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste-wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials* 165, 1119-1123.
- Albaladejo, J., Ortiz, R., García-Franco, N., Ruiz-Navarro, A., Almagro, M., García-Pintado, J., Martínez-Mena, M. 2012. Land use and climate change

impacts on soil organic carbon stocks in semi-arid Spain. *Journal of Soils and Sediments*, doi: 10/1007/s11368-012-0617-7.

Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M.C., López-Piñeiro, A., Cornejo, J. 2004. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive oil extraction process. *Chemosphere* 54 (6), 717-724.

Alburquerque, J.A., de la Fuente, C., Bernal, M.P. 2011. Improvement of soil quality after "alperujo" compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *Journal of Environmental Management* 92, 733-741.

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* 91, 195-200.

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2006a. Composting of a solid olive-mill by-product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management* 26, 620-626.

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2006b. 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 (3), 470-477.

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2007. Effects of a compost made from the solid by-product ("alperujo") of the two-phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresource Technology* 98, 940-945.

- Alburquerque, J.A., González, J., Tortosa, G., Ait Baddi, G., Cegarra, J. 2009. Evaluation of “alperujo” composting based on organic matter degradation, humification and compost quality. *Biodegradation* 20 (2), 257-270.
- Alfano, G., Lustrato, G., Lima, G., Vitullo, D., Ranalli, G. 2011. Characterization of composted olive mill wastes to predict potential plant disease suppressiveness. *Biological Control* 58, 199-207.
- Altieri, R. y Esposito, A. 2010. Evaluation of the fertilizing effect of olive mill waste compost in short-term crops. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 124-128.
- Altieri, R. y Esposito, A. 2008. Olive orchard attended with two experimental olive mill wastes mixtures: Effects on soil organic carbon, plant growth and yield. *Bioresource Technology* 99, 8390-8393.
- Altieri, R., Esposito, A., Parati, F., Lobianco, A., Pepi, M. 2009. Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63 (8), 993-997.
- Al-Widyan, M.I., Al-Abed, N., Al-Jalil, H. 2005. Effect of composted olive cake on soil physical properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36 (9-10), 1199-1212 .
- Aviani, I., Laor, Y., Medina, Sh., Krassnovsky, A., Raviv, M. 2010. Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: Management aspects and the horticultural value of the resulting composts. *Bioresource Technology* 101, 6699-6706.
- Barrena, R., Vázquez, F., Sánchez, A., 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Management Research* 24, 37–47.

- Beck-Friis, B., Pell, M., Sonesson, U., Jönsson, H., Kirchmann, H. 2000. Formation and emission of N₂O and CH₄ from compost heaps of organic household waste. *Environmental Monitoring and Assessment* 62, 317–331.
- Béline, F., Martinez, J., Chadwick, D., Guiziou, F., Coste, C.M. 1999. Factors affecting nitrogen transformations and related nitrous oxide emissions from aerobically treated piggery slurry. *Journal of Agricultural Engineering Research* 73, 235–243.
- Beltrán, G., Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L. 2004. Maduración. En: Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. (Eds.). *El cultivo del Olivo*. 5ª Edición, Mundi-Prensa, Madrid.
- Bianco, A., Chiacchio, M.A., Grassi, G., Innazzo, D., Piperno, A., Romeo, R. 2006. Phenolic components of *Olea europaea*: isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry* 95, 562-565.
- Blanco-Canqui, H y Lal, R. 2004. Mechanisms of carbon sequestration in soil aggregates. *Critical Reviews in Plant Science* 23: 481-504.
- Boldrin, A., Andersen, J.K., Moller, J., Christensen, T.H., Favoino, E. 2009. Composting and compost utilization: accounting of greenhouse gases and global warming contributions. *Waste Management Research* 27, 800-812.
- Boletín de Compostaje para Producción Ecológica nº 1T-2012.
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/areas-tematicas/produccion-ecologica/produccion/agricultura-ecologica/boletines/boletines-de-compostaje-para-produccion-ecologica.html>
- Brown, S., Kruger, C., Subler, S. 2008. Greenhouse gas balance for composting operations. *Journal of Environmental Quality* 37, 1396–1410.

- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz Civantos, C., Cornejo, J. 2009. Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 132, 260-266.
- Cabrera, D., López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Peña, D. 2010. Direct and residual effects on diuron behaviour and persistence following two-phase olive mill waste addition to soil: Field and laboratory experiments. *Geoderma* 157 (3-4), 133-141.
- CARM, 2011. Estadística Agraria Regional. Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. (Fecha de consulta: julio, 2012).
- Cayuela, M.L. 2004. Producción industrial de compost ecológico a partir de residuos de almazara. PhD Thesis, University of Murcia.
- Cayuela, M.L., Bernal, M.P., Roig, A. 2004. Composting olive mill waste and sheep manure for orchard use. *Compost Science and Utilization* 12, 130-136.
- Cayuela, M.L., Millner, P.D., Meyer, S.L.F., Roig, A. 2008a. Potential of olive mill waste and compost as biobased pesticides against weeds, fungi and nematodes. *Science of the Total Environment* 399, 11-18.
- Cayuela, M.L., Mondini, C., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A. 2008b. Chemical properties and hydrolytic enzyme activities for the characterisation of two-phase olive mill wastes composting. *Bioresource Technology* 99 (10), 4255-4262.
- Cayuela M.L., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A. 2006. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry* 41, 616-623.

- Cayuela M.L., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A. 2010. Two-phase olive mill waste composting: enhancement of the composting rate and compost quality by grape stalks addition. *Biodegradation* 21 (3), 465-473.
- Cayuela M.L., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Sinicco, T., Mondini, C. 2012. Biochemical changes and GHG emissions during composting of lignocellulosic residues with different N-rich by-products. *Chemosphere* 88 (2), 196-203.
- Chandra, M. y Sathivelu, S. 2009. Waste management in the olive oil industry in the Mediterranean region by composting. *Clean Technologies and Environmental Policy* 11, 293-298.
- Chatterjee, A. y Lal, R. 2009. On farm Assessment of tillage impacts on soil Carbon and associated soil quality parameters. *Soil & Tillage Research* 104, 270-277.
- Civantos L. 2004. La olivicultura en el mundo y en España. En: *El cultivo del olivo*. 5ª Edición, Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 800 pp.
- Clemens, J., Cuhls, C. 2003. Greenhouse gas emissions from mechanical and biological waste treatment of municipal waste. *Environmental Technology* 24, 745–754.
- Colón, J., Cadena, E., Sánchez, A., Artola, A., Font, X. 2012. Impactos ambientales de las instalaciones de tratamiento biológico de residuos orgánicos de origen municipal. *Ingeniería Química (Spain)* 44 (507), 62-67.
- Czepiel, P., Douglas, E., Harriss, R., Crill, P. 1996. Measurements of N₂O from composted organic wastes. *Environmental Sci. Technol.* 30, 2519–2525.
- D'Addabbo, T., Papajová, I., Sasanelli, N., Radicci, V., Renco, M. 2011. Suppression of root-knot nematodes in potting mixes amended with different composted biowastes. *Helminthologia*, 48 (4), 278-287.

- de Klein, C.A.M. y Eckard, R.J. 2008. Targeted technologies for nitrous oxide abatement from animal agriculture. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 14-20.
- de la Fuente, C., Clemente, R., Martínez-Alcalá, I., Tortosa, G., Bernal, M.P. 2011. Impact of fresh and composted solid olive husk and their water-soluble fractions on soil heavy metal fractionation; microbial biomass and plant uptake. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1283-1289.
- Delgado-Moreno, L., Almendros, G., Peña, A. 2007. Raw or incubated olive-mill wastes and its biotransformed products as agricultural soil amendments- Effect on sorption-desorption of triazine herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 836-843.
- Delgado-Moreno, L. y Peña, A. 2009. Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil. *Science of the Total Environment* 407 (5), 1489-1495.
- Delgado-Moreno, L. y Peña, A. 2007. Organic amendments from olive cake as a strategy to modify the degradation of sulfonylurea herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (15), 6213-6218.
- Dumanski, J. 2004. Carbon sequestration, soil conservation and the Kyoto Protocol: summary of implications. *Climate Change* 65, 255-261.
- El Kader, N.A., Robin, P., Paillat, J.M., Leterme, P. 2007. Turning, compacting and the addition of water as factors affecting gaseous emissions in farm manure composting. *Bioresource Technology* 98, 2619–2628.
- FAOSTAT, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (Fecha de consulta: 31/07/12)

- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén Bejarano, R., Jiménez, A. 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing (alperujo). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50 (23), 6804-6811.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A. y Borja Padilla, R. 1992. Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. *Grasas y Aceites* 43, 101-106.
- Filippi, C., Bedini, S., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Saviozzi, A. 2002. Cocomposting of olive oil mill by-products: Chemical and microbiological evaluations. *Compost Science and Utilization* 10 (1), 63-71.
- Freibauer, A., Rounsevell, M.D.A., Smith, P., Verhagen, J. 2004. Carbon sequestration in the agricultural soils of Europe. *Geoderma* 122, 1-23.
- Fukumoto, Y. e Inubushi, K. 2009. Effect of nitrite accumulation on nitrous oxide emission and total nitrogen loss during swine manure composting. *Soil Science and Plant Nutrition* 55 (3), 428-434.
- Fukumoto, Y., Suzuki, K., Osada, T., Hanajima, D., Yasuda, T., Haga, K. 2006. Reduction of nitrous oxide emission from pig manure composting by addition of nitrite-oxidizing bacteria. *Environmental Science and Technology* 40, 6787-6791.
- García-Maraver, A., Zamorano, M., Ramos-Ridao, A., Díaz, L.F. 2012. Analysis of olive grove residual biomass potential for electric and thermal energy generation in Andalusia (Spain). *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 745-751.
- Hachicha, S., Chtourou, M., Medhioub, K., Ammar, E. 2006. Compost of poultry manure and olive mill wastes as an alternative fertilizer. *Agronomy for sustainable Development* 26 (2), 135-142.

- Hao, X., Chang, C., Larney, F.J. 2004. Carbon, nitrogen balances and greenhouse gas emission during cattle feedlot manure composting. *Journal of Environmental Quality* 33 (1), 37-44.
- Hao, X., Chang, C., Larney, F.J., Travis, G.R. 2001. Greenhouse gas emissions during cattle feedlot manure composting. *Journal of Environmental Quality* 30, 376–386.
- Haug, R.T. 1993. *The practical Handbook of compost Engineering*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida.
- He, Y., Inamori, Y., Mizuochi, M., Kong, H., Iwami, N., Sun, T. 2000. Measurements of N₂O and CH₄ from the aerated composting of food waste. *Science of the Total Environment* 254, 65–74.
- Hellmann, B., Zelles, L., Palojarvi, A., Bai, Q. 1997. Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1011–1018.
- Hobson, A.M., Frederickson, J., Dise, N.B. 2005. CH₄ and N₂O from mechanically turned windrow and vermicomposting systems following in-vessel pretreatment. *Waste Management* 25, 345–352.
- Holland, J.M. 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103, 1–25.
- Hwang, S. y Hanaki, K. 2000. Effects of oxygen concentration and moisture content of refuse on nitrification, denitrification and nitrous oxide production. *Bioresource Technology* 71 (2), 159-165.
- IMPEL, 2003. European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law. Olive Oil Project.

<http://impel.eu/projects/olive-oil-project-2/> (Fecha de consulta: julio, 2012).

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2003. En: Good Practice Guidance for Land Use, Land-Use Change and Forestry. Penman, J., Gytarsky, M., Hiraishi, T., Krug, T., Kruger, D., Pipatti, R., Buendia, L., Miwa, K., Ngara, T., Tanabe, K., Wagner, F. (Eds.). Institute for Global Environmental Strategies, Japan.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2006. IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.html> (Acceso 04/2010).

Jäckel, U., Thummes, K., Kämpfer, P. 2005. Thermophilic methane production and oxidation in compost. FEMS Microbiology Ecology 52, 175–184.

Janzen, H.H. 2004. Carbon cycling in earth systems-a soil science perspective. Agriculture, Ecosystems and Environment 104, 399-417.

Jenkinson, D.S., 1981. The fate of plant and animal residues in soil. In: Greenland, D.J., Hayes, M.H.B. (Eds.), The Chemistry of Soil Processes. John Wiley, New York, USA, pp. 505–561.

Kebreab, E., Clark, K., Wagner-Riddle, C., France, J. 2006. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian animal agriculture: a review. Canadian Journal of Animal Science 86, 135–158.

Kobek, I. 2004. Setting up a network of technology dissemination centres to optimise SMEs in the olive and olive oil sector. Waste Treatment. (European Commission). <http://www.tdcololive.net/>

Kowalchuk, G.A., Naoumenko, Z.S., Derikx, P.J.L., Felske, A., Stephen, J.R., Arkhipchenko, I.A. 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the Class *Proteobacteria* in compost and composted materials. Applied Environmental Microbiology 65, 396–403.

- Krull, E.S., Baldock, J.A., Skjemstad, J.O. 2003. Importance of mechanisms and processes of the stabilization of soil organic matter for modelling carbon turnover. *Functional Plant Biology* 30, 207-222.
- Kuroda, K., Osada, T., Yonaga, M., Kanematu, A., Nitta, T., Mouri, S., Kojima, T. 1996. Emissions of malodorous compounds and greenhouse gases from composting swine feces. *Bioresource Technology* 56, 265–271.
- Kuzyakov, Y. 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 425-448.
- Lal, R. 2006. Enhancing crop yields in the developing countries through restoration of the soil organic carbon pool in agricultural lands. *Land Degradation and Development* 17 (2), 197-209.
- Lal, R. 2003. Global potential of soil carbon sequestration to mitigate the greenhouse effect. *Critical Review in Plant Science* 22, 151-184.
- Lal, R. 2004a. Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.
- Lal, R. 2004b. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304, 1623-1627.
- Lal, R. 2008. Soils and sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28 (1), 57-64.
- Lal, R. y Kimble, J.M. 2000. Pedogenic carbonate and the global carbon cycle. En: *Global climate change and pedogenic carbonates*. Lal, R., Kimble, J.M. y Stewart, D.A. (Eds). CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 1-14.
- Lesage-Messen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J.L., Asther, M., Labat, M. 2001. Simple phenolic

- content in oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry* 75, 501-507.
- Lewis, N.G. y Yamamoto, E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 455-496.
- Lima, G., Piedimonte, D., De Curtis, F., Elgelane, A.A., Nigro, F., D'Onghia, A.M., Alfano, G., Ranalli, G. 2008. Suppressive effect of cured compost from olive oil by-products towards *Verticillium dahliae* and other fungal pathogens. *Acta Horticulturae* 791, parte 2, 585-591.
- Linares, A., Caba, J.M., Ligeró, F., De la Rubia, T., Martínez, J. 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavido-alba*. *Chemosphere* 51, 887-891.
- López-Cuervo, S. 1990. La erosión en los suelos agrícolas y forestales de Andalucía. Colección Congresos y Jornadas N° 17/1990, 11-16. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Rato Nunes, J.M., Barreto, C. 2008a. Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid Mediterranean conditions. *Bioresource Technology* 99 (17), 7982-7987.
- López-Piñeiro, A., Albarrán, A., Rato Nunes, J.M., Peña, D., Cabrera, D. 2011a. Cumulative and residual effects of two-phase olive mill waste on olive grove production and soil properties. *Soil Science Society of America Journal* 75 (3), 1061-1069.
- López-Piñeiro, A., Cabrera, D., Albarrán, A., Peña, D. 2011b. Influence of two-phase olive mill waste application to soil on terbutylazine behaviour and persistence under controlled and field conditions. *Journal of Soils and Sediments* 11 (5), 771-782.

- López-Piñeiro, A., Fernández, J., Albarrán, A., Rato Nunes, J.M., Barreto, C. 2008b. Effects of de-oiled two-phase olive mill waste on Mediterranean soils and the wheat crop. *Soil Science Society of America Journal* 72 (2), 424-430.
- López-Piñeiro, A., Murillo, S., Barreto, C., Muñoz, A., Rato, J.M., Albarrán, A., García, A. 2007. Changes in organic matter and residual effect of amendment with two-phase olive-mill waste on degraded agricultural soils. *Science of the Total Environment* 378, 84-89.
- Lou, X.F. y Nair, J. 2009. The impact of landfilling and composting on greenhouse gas emissions – a review. *Bioresource Technology* 100, 3792–3798.
- Loveland, P. y Webb, J. 2003. Is there a critical level of organic matter in the agricultural soils of temperate regions: a review. *Soil and Tillage Research* 70, 1-18.
- Maeda, K., Hanajima, D., Toyoda, S., Yoshida, N., Morioka, R., Osada, T. 2011. Microbiology of nitrogen cycle in animal manure compost. *Microbial Biotechnology* 4 (6), 700-709.
- MAGRAMA, 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de Estadística 2010.
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estad-publicaciones/anuario-de-estadistica/2010/default.aspx>
- Madejón, E., Galli, E., Tomati, U. 1998. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica* 42 (3-4), 135-146.
- Manios, T., Maniadakis, K., Kalogeraki, M., Mari, E., Stratakis, E., Terzakis, S., Boytzakis, P., Naziridis, Y., Zampetakis, L. 2006. Efforts to explain and

control the prolonged thermophilic period in two-phase olive oil mill sludge composting.

Mondini, C., Coleman, K., Whitmore, A.P. 2012. Spatially explicit modelling of changes in soil organic C in agricultural soils in Italy, 2001–2100: Potential for compost amendment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 153, 24-32.

Montemurro, F., Diacono, M., Vitti, C., Debiase, G. 2009. Biodegradation of olive husk mixed with other agricultural wastes. *Bioresource Technology*, doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.038

Montemurro, F., Diacono, M., Vitti, C., Ferri, D. 2011. Short-term agronomical effects of olive oil pomace composts on *Pisum arvense* L. and *Trifolium subterraneum* L. and impacts on soil properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42 (18), 2256-2264.

Montemurro, F., Maiorana, M., Convertini, G., Ferri, D. 2006. Compost organic amendments in fodder crops: Effects on yield, nitrogen utilization and soil characteristics. *Compost Science and Utilization* 14 (2), 114-123.

Moreno, J. y Mormeneo, S. 2008. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J. y Moral, R. (Eds.). *Compostaje*. Mundi-Prensa, Madrid.

Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 25-39.

Nasini, L., Gigliotti, G., Balduccini, M.A., Federici, E., Cenci, G., Proietti, P. 2013. Effect of solid olive-mill waste amendment on soil fertility and olive (*Olea europaea* L.) tree activity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 164, 292-297.

- Nastri, A., Ramaglia, R., Marzadori, C., Ciavatta, C. 2006. Olive pulp and its effluents suitability for soil amendment. *Journal of Hazardous Materials A* 138, 211-217.
- Nektarios, P.A., Ntoulas, N., Mcelroy, S., Volterrani, M., Arbis, G. 2011. *Agronomy Journal* 103 (5), 1524-1531.
- Nogales, R. y Benítez, E. 2006. Absorption of Zinc and Lead by *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 538-544.
- Nogales, R. y Benítez, E. 2007. Effect of olive-derived organic amendments on lead, zinc and biochemical parameters of an artificially contaminated soil. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 38 (5-6), 795-811.
- Pannelli, G., Servili, M., Baldioli, M., Montedoro, G.F. 1991. Changes in the phenolic and pectic substances in olive fruit and oil as a function of ripening, cultivar and extraction technology. *OLEA* 21, 64.
- Pardo, T., Clemente, R., Bernal, M.P. 2011. Effects of compost, pig slurry and lime on trace element solubility and toxicity in two soils differently affected by mining activities. *Chemosphere* 84, 642-650.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P. 1999. Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* 67, 111-115.
- Pastor, M. 2004. Sistemas de manejo del suelo. En: Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L. (Eds.). *El cultivo del Olivo*. 5ª Edición, Mundi-Prensa, Madrid.
- Pel, R., Oldenhuis, R., Brand, W., Vos, A., Gottschal, J.C., Zwart, K.B. 1997. Stable-isotope analysis of a combined nitrification–denitrification sustained

by thermophilic methanotrophs under low-oxygen conditions. *Applied Environmental Microbiology* 63, 474–481.

Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Mondelli, D. 2005. Co-composting of sludge from olive oil mill wastewater mixed with tree cuttings. *Compost Science and Utilization* 13, 217-226.

Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Mondelli, D. 2006. Evolution of the fulvic acid fractions formed during co-composting of olive oil mill wastewater sludge and tree cuttings. *Bioresource Technology*, doi: 10.1016/j.biortech.2006.07.051.

Powlson, D.S., Bhogal, A., Chambers, B.J., Macdonald, A.J., Coleman, K., Goulding, K.W.T., Whitmore, A.P. 2012. The potential to increase soil carbon stocks through reduced tillage or organic additions – an England and Wales case study. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 146, 23–33.

Powlson, D.S., Glendining, M.J., Coleman, K., Whitmore, A.P., 2011. Implications for soil properties of removing cereal straw: results from long-term studies. *Agronomy Journal* 103, 279–287.

Red Andaluza de Compostaje para la Agricultura Ecológica (RACAE). 2008. http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/cap/produccion-ecologica/racae_primer_trimestre_08.pdf

Reeves, D.W. 1997. The role of soil organic matter in maintaining soil quality in continuous cropping systems. *Soil and Tillage Research* 43, 131-167.

Renco, M., D'Addabbo, T., Sasanelli, N., Papajová, I. 2007. The effect of five compost of different origin on the survival and reproduction of *Globodera rostochiensis*. *Nematology* 9 (4), 537-543.

- Renco, M., Sasanelli, N., D'Addabbo, T., Papajová, I. 2010. Soil nematode community changes associated with compost amendments. *Nematology* 12 (5), 681-692.
- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Saviozzi, A., Viti, G. 1997. Carbon Mineralization potential of soils amended with sludge from olive processing. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 30-37.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26, 960-969.
- Romanyà J., Rovira P., Vallejo R. 2007. Análisis del carbono en los suelos agrícolas de España. Aspectos relevantes en relación a la reconversión a la agricultura ecológica en el ámbito mediterráneo. *Ecosistemas* 2007/1.
- Saadi, I., Laor, Y., Raviv, M., Medina, S. 2007. Land spreading of olive mill wastewater: Effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere* 66, 75-83.
- Saija, A. y Uccella, N. 2000. Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends in Food Science and Technology* 11(9-10), 357-363.
- Sánchez-Monedero, M.A., Cayuela, M.L., Mondini, C., Serramiá, N., Roig, A. 2008. Potential of olive mill wastes for soil C sequestration. *Waste Management* 28, 767-773.
- Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., García, D., Roig, A. 2002. Chemical and structural evolution of humic acids during organic waste composting. *Biodegradation* 13, 361-371.
- Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M.P. 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology* 78, 301–308.

- Sasanelli, N., D'Addabbo, T., Mancini, L. 2011. Suppressive effect of composted olive mill wastes soil amendments on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Acta Horticulturae* 914, 229-231.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Biasci, A., Riffaldi, R. 2001. Suitability of moist olive pomace as soil amendment. *Water, Air and Soil Pollution* 128, 13-22.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., Aloui, F. 2000. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry* 35, 725-735.
- Schlesinger, W.H. y Andrews J.A. 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 48, 7-20.
- Senesi, N., Plaza, C., Brunetti, G., Polo, A. 2007. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1244–1262.
- Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241, 155-176.
- Smith, P. 2004a. Carbon sequestration in croplands: the potential in Europe and the global context. *European Journal of Agronomy* 20, 229–236.
- Smith, P., 2004b. Monitoring and verification of soil carbon changes under article 3.4 of the Kyoto Protocol. *Soil Use and Management* 20, 264–270.
- Smith, P. 2008. Land use change and soil organic carbon dynamics. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 81 (2), 169-178.

- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., Howden, M., McAllister, T., Pan, G., Romanenkov, V., Schneider, U., Towprayoon, S. 2007. Policy and technological constraints to implementation of greenhouse gas mitigation options in agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 118, 6-28.
- Soliva, M., López, M., Huerta, O. 2008. Pasado, presente y futuro del compost. II International Conference on Soil and Compost Eco-Biology.
- Sommer, S.G. y Møller, H.B. 2000. Emission of greenhouse gases during composting of deep litter from pig production - effect of straw content. *The Journal of Agricultural Science* 134 (3), 327-335.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2nd Edition, Wiley, New York.
- Stewart, C.E., Paustian, K., Conant, R.T., Plante, A.F., Six, J. 2007. Soil carbon saturation: concept, evidence and evaluation. *Biogeochemistry* 86, 19-31.
- Szanto, G.L., Hamelers, H.V.M., Rulkens, W.H., Veeken, A.H.M. 2007. NH₃, N₂O and CH₄ emissions during passively aerated composting of straw-rich pig manure. *Bioresource Technology* 98, 2659–2670.
- Tate, R.L. 1987. *Soil organic matter. Biological and ecological effects*. John Willey & Sons. New York.
- Tejada, M. y González, J.L. 2004. Effects of foliar application of a by-product of the two-step olive oil mill process on rice yield. *European Journal of Agronomy* 21, 31-40.
- Tejada, M. y González, J.L. 2007. Influence of organic amendments on soil structure and soil loss under simulated rain. *Soil and Tillage Research* 93 (1), 197-205.

- Thompson, R.B. y Nogales, R. 1999. Nitrogen and carbon mineralization in soil of vermicomposted and unprocessed dry olive cake ('orujo seco') produced from two-stage centrifugation for olive oil extraction. *Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 34, 917-928.
- Trigo, C. y Ball, A.S. 1994. Production of extracellular enzymes during the solubilization of straw by *Thermomonospora fusca* BD25. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 366-372.
- UNFCCC, 1997. Kyoto Protocol to the United Nations Framework on Climate Change (UNFCCC), 1997. FCCC/CP/1997/7/Add.1.
<http://unfccc.int/resource/docs/cop3/107a01.pdf>
- Walker, D.J. y Bernal, M.P. 2008. The effects of olive mill waste compost and poultry manure on the availability and plant uptake of nutrients in a highly saline soil. *Bioresource Technology* 99 (2), 396-403.
- West, T. y Six, J. 2007. Considering the influence of sequestration duration and carbon saturation on estimates of soil carbon capacity. *Climatic Change* 80, 25-41.
- Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O., 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1723– 1732.
- Yamamoto, A., Short, M.D., Van Den Akker, B., Cromar, N.J., Fallowfield, H.J. 2010. Nitrification potential in waste stabilisation ponds: comparison of a secondary a tertiary pond system. *Water Science and Technology* 61 (3), 781-788.

Zeman, C., Depken, D., Rich, M. 2002. Research on how the composting process impacts greenhouse gas emissions and global warming. *Compost Science & Utilization* 10 (1), 72-86.

Zeng, J., Zhao, D.Y., Huang, R., Wu, Q.L. 2012. Abundance and community composition of ammonia-oxidizing *archaea* and bacteria in two different zones of Lake Taihu. *Canadian Journal of Microbiology* 58 (8), 1018-1026.

III. PARTE EXPERIMENTAL

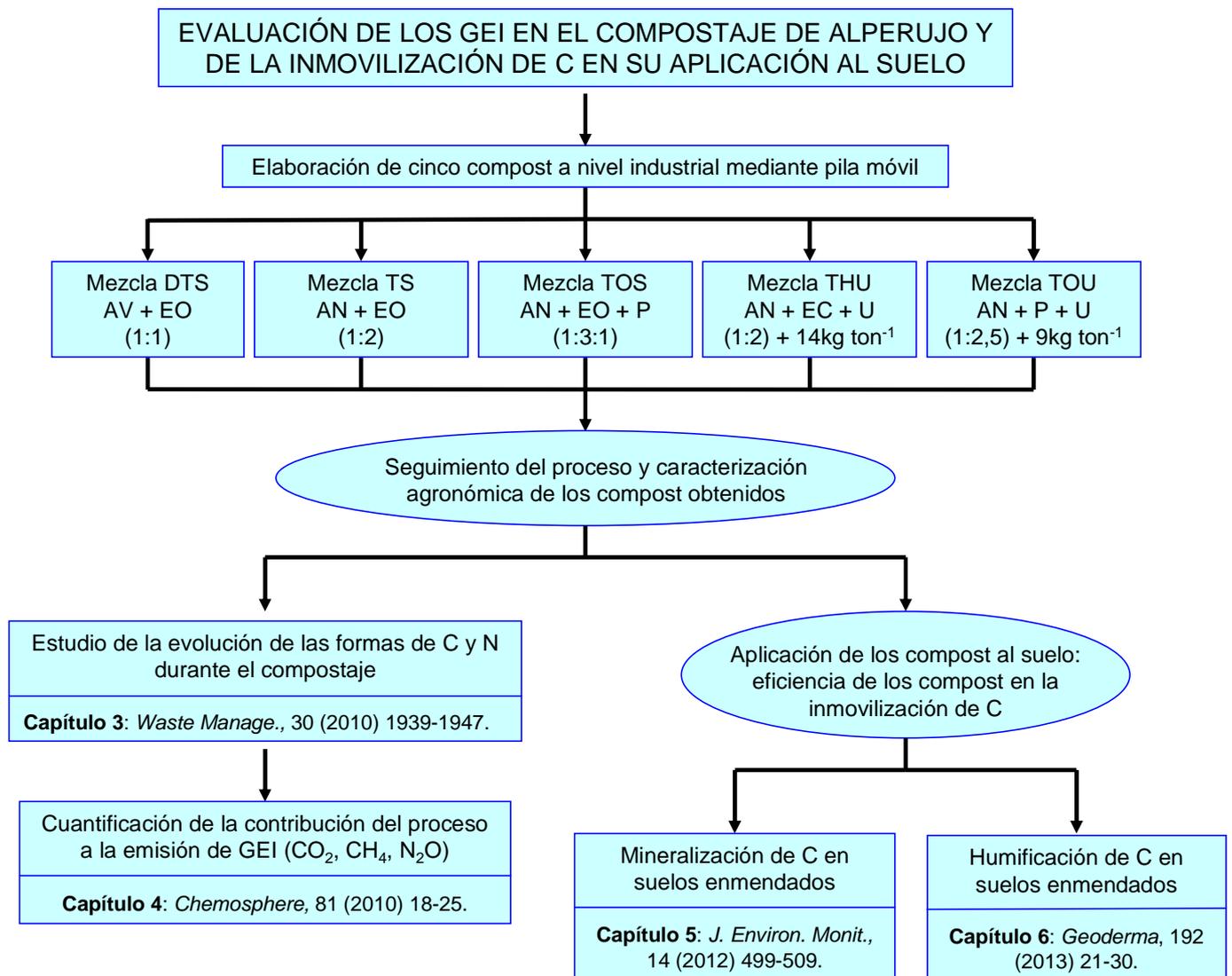


III.1. Esquema de trabajo.

El trabajo realizado ha sido el seguimiento del ciclo de vida del alperujo, desde su generación hasta su aplicación al suelo como compost, con el fin de determinar los beneficios netos de este proceso sobre el secuestro de carbono. La memoria de tesis se presenta como compendio de publicaciones, las cuales se presentan a continuación.

La primera experiencia se centra en el proceso de compostaje del alperujo con diferentes residuos agrícolas y se muestra la relación entre la velocidad de mineralización de la MO y la degradación de la fracción lignocelulósica, responsable de la larga duración del proceso. En la segunda se cuantifican las emisiones de CO₂, N₂O y CH₄ durante el compostaje de alperujo. En este trabajo se pone de manifiesto el efecto de la composición inicial de las mezclas y del manejo de las pilas sobre el control de los flujos de los GEI durante el proceso de compostaje. La tercera de las publicaciones estudia la influencia de la composición y grado de estabilización de las mezclas de compost en la capacidad para estabilizar carbono en suelos enmendados, así como el efecto del tipo de suelo, mediante la monitorización de la medida del CO₂ desprendido de los suelos enmendados. Finalmente, en la cuarta experiencia se presenta el estudio de los mecanismos de humificación de las distintas mezclas de compost de alperujo una vez añadido al suelo.

Este trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación sobre compostaje de residuos orgánicos puesta en marcha en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Los experimentos presentados en esta tesis se han realizado en el marco de un proyecto subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (REF. CTM2005-05324).



III.2. Publicaciones.

2.1 Contribución de la fracción lignocelulósica del alperujo a la degradación y humificación de la materia orgánica durante el compostaje.

El contenido del artículo publicado ha sido sustituido por la siguiente información:

- Denominación de la revista: *Waste Management*.
- Dirección url donde se encuentra publicado:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2010.04.031>
- Resumen del artículo:

Una de las características que presenta el compostaje de alperujo es la larga duración del proceso que se puede extender hasta las 40 semanas. El objetivo de este capítulo es establecer la relación entre la degradación de la fracción lignocelulósica del alperujo y la velocidad de mineralización de la materia orgánica (MO) en cuatro pilas de compostaje preparadas con distintos agentes estructurantes y fuentes de nitrógeno utilizados para mejorar el proceso de descomposición. La cinética de la degradación de la fracción lignocelulósica se compara con índices convencionales de madurez y estabilidad de la MO durante el compostaje para evaluar su impacto sobre la duración del proceso. Se observa que la composición química de los materiales utilizados como agentes estructurantes afecta principalmente a la fracción hidrosoluble cuya degradación marca la cinética de descomposición de la MO (perfil lineal o exponencial) en las etapas iniciales del proceso, pero no modifica la duración del proceso (entre 34 y 36 semanas) ni la cantidad total de MO mineralizada en las distintas pilas. Una elevada disponibilidad inicial de N mineral es un factor clave para aumentar de forma significativa la actividad de los microorganismos. La mezcla en la que se utiliza urea como fuente de N experimenta la degradación más eficiente de hemicelulosa, celulosa y lignina, reduce la fase termófila y la duración total del proceso de compostaje.

➤ Abstract:

One of the main disadvantages in the composting of two-phase olive mill wastes (TPOMW) is the long time required for its transformation (up to 40 weeks). The aim of this work was to evaluate the relationship between the degradation of the lignocellulosic fraction of TPOMW and the organic matter (OM) mineralisation rate in four composting piles prepared with different bulking agents and N-sources used to enhance OM degradation. The kinetics of degradation of the lignocellulosic fraction was compared to conventional maturation and stability indices to evaluate its impact on the duration of the composting process. The composition of bulking agents mainly affected the water-soluble fraction which influenced the OM degradation rate (linear or exponential OM degradation pattern) at early stages of the composting process but it neither modified the duration of the process (between 34 and 36 weeks) nor the total OM degradation underwent by the piles. The high initial mineral N availability was a key factor to significantly enhanced microbial activity. The mixture with urea as N-source registered the most efficient degradation of hemicellulose, cellulose and lignin, reducing the thermophilic phase and the total duration of TPOMW composting.

2.2 Emisiones de gases de efecto invernadero durante el compostaje de alperujo con distintos subproductos agrícolas.

El contenido del artículo publicado ha sido sustituido por la siguiente información:

- Denominación de la revista: *Chemosphere*.
- Dirección url donde se encuentra publicado:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.022>
- Resumen del artículo:

En este trabajo se evalúa el efecto de la composición inicial de las mezclas y la fuente de nitrógeno en las emisiones de GEI (CO₂, CH₄ y N₂O) durante el compostaje de alperujo. Los flujos de estos gases sobre la superficie de las pilas se miden utilizando un sistema estático de cámara cerrada y se comparan con los cambios sufridos en las distintas fracciones de MO (carbono orgánico e hidrosoluble) y formas de nitrógeno (NH₄⁺ y NO₃⁻). Las emisiones de CH₄ son dependientes de la dinámica de mineralización de la MO y de la incorporación de estiércol en la mezcla inicial. Los mayores flujos de CH₄ se registran en las primeras fases del proceso cuando la degradación de MO es más intensa (hasta 100 g C m⁻² d⁻¹). La emisión de N₂O (0-0.9 g N m⁻² d⁻¹) tiene lugar desde la sexta a la décima semana de compostaje (fase bio-oxidativa) coincidiendo con una intensa nitrificación en la pila. El uso de urea aumenta la emisión de N₂O hasta 3.7 g N m⁻² d⁻¹, debido a un aumento en la disponibilidad de N mineral. Llevando a cabo un manejo adecuado de las pilas de compostaje, las emisiones de CH₄ y N₂O no son importantes durante el compostaje de alperujo. La adición de urea y fuentes de carbono fácilmente degradables en las mezclas iniciales puede aumentar significativamente el impacto medioambiental del compostaje de alperujo en cuanto a la emisión de GEI.

➤ Abstract:

The evolution of CO₂, CH₄ and N₂O were monitored in five composting mixtures prepared from two-phase olive mill waste (TPOMW) and different agroindustrial by-products in order to assess the effect of the initial composition and the N source on greenhouse gas emission. Surface gas fluxes were measured using a closed static chamber and compared to the changes in different organic matter fractions (organic and watersoluble C) and N forms NH₄⁺ and NO₃⁻). CH₄ emissions depended on the organic matter mineralisation dynamics and the incorporation of manure in the starting mixture. The highest CH₄ fluxes were registered during the intense degradation at early stages of the process (up to 100 g C m⁻² d⁻¹). The emission of N₂O (0–0.9 g N m⁻² d⁻¹) occurred from 6th to 10th wk of composting (bioxidative phase), coinciding with an intense nitrification in the pile. The use of urea enhanced the N₂O emission up to 3.7 g N m⁻² d⁻¹, due to an increase in available mineral N in the pile. Even though well managed TPOMW composting piles only represent a minor source of CH₄ and N₂O emissions, the addition of urea and easily available C fractions to the starting mixtures can significantly increase the environmental impact of TPOMW composting as far as greenhouse gas emissions are concerned.

2.3 Mineralización del alperujo en suelos enmendados: efecto de la composición lignocelulósica de la materia orgánica sobre la dinámica del carbono en el suelo.

El contenido del artículo publicado ha sido sustituido por la siguiente información:

➤ Denominación de la revista: *Journal of Environmental Monitoring*.

➤ Dirección url donde se encuentra publicado:

<http://dx.doi.org/10.1039/c1em10490j>

➤ Resumen del artículo:

Una de las características principales del alperujo es su lenta velocidad de degradación, tanto durante su compostaje como tras su aplicación al suelo. El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de la relación existente entre la fracción lignocelulósica del alperujo y la velocidad de degradación de la materia orgánica (MO) en tres suelos agrícolas enmendados con cuatro mezclas de compost de alperujo con distinto grado de estabilidad y preparadas con distintos agentes estructurantes y fuentes de N. La cinética de mineralización de las mezclas en el suelo muestra una gran cantidad de carbono lentamente mineralizable, incluso en las mezclas correspondientes al inicio (I) y primeras semanas de compostaje (T1) en las que esta fracción de carbono representa hasta un 85% del total de carbono potencialmente mineralizable. El efecto que ejerce la rica composición lignocelulósica se confirma con el estudio de las mezclas preparadas con alperujo seco (mezclas DTS: 50% alperujo seco + 50% estiércol de oveja), el cual ya había sufrido degradación parcial tras un año almacenado en una balsa de desecación antes de su compostaje. Estas muestras muestran una cinética de descomposición en el suelo similar a la de las mezclas más transformadas. Este comportamiento se refleja a su vez en un análisis de componentes principales en el que se agruparon en el mismo cuadrante dominado por la relación lignina/holocelulosa. En los suelos

enmendados con los compost maduros se mineralizan cantidades muy bajas de carbono (entre un 2 y un 6 % del carbono añadido) tras dos meses de incubación, lo cual hace subrayar la adecuación de estos materiales como fuente de carbono en el suelo para promover la estabilización de carbono a largo plazo.

➤ Abstract:

The low degradation rate of two-phase olive mill wastes (TPOMW) during composting and after soil application is a characteristic feature of these materials. The aim of this work was to evaluate the relationship between the lignocellulosic fraction of TPOMW and the organic matter (OM) degradation rate in three agricultural soils amended with four TPOMW composting mixtures at different degree of stabilisation and prepared with different bulking agents and N sources. The mineralisation kinetics of TPOMW composting mixtures in soil reflected a large amount of slowly mineralisable C even in the starting mixtures (I and T1) where this fraction represented up to 85% of the total potentially mineralisable C pool. The effect of rich lignocellulosic composition was confirmed by the study of the DTS (50% dry TPOMW + 50% sheep manure) mixtures prepared with dry TPOMW, which had undergone partial degradation in a storage pond for one year before composting. These DTS samples showed a more similar kinetic behaviour in soil than the more transformed composting mixtures as reflected in the principal component analysis (PCA) diagram, where they were grouped in the same quadrant dominated by the lignin/holocellulose ratio. Soils amended with mature composts evolved very low amounts of C (between 2 and 6% of the added C) after two months of incubation, which highlights the suitability of these materials as a suitable C source for the soil to promote long term soil C stabilisation

2.4 Cambios en el carbono húmico del suelo tras la aplicación de compost de alperujo.

El contenido del artículo publicado ha sido sustituido por la siguiente información:

- Denominación de la revista: *Geoderma*.
- Dirección url donde se encuentra publicado:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.032>
- Resumen del artículo:

La aplicación de enmiendas orgánicas producidas a partir del compostaje de alperujo es una opción muy adecuada para mantener y restaurar los niveles de carbono en suelos agrícolas bajo clima Mediterráneo. En este trabajo se estudian los mecanismos de estabilización de la MO entre las distintas fracciones húmicas de un Cambisol calcárico enmendado con un 2% (40 mg ha⁻¹) de mezclas de compost de alperujo de diferente composición y madurez: mezcla inicial, etapa termófila (tras 14 semanas de compostaje) y compost maduro (tras 30 semanas de compostaje). Para ello, se obtienen el carbono orgánico del suelo no humificado y dos fracciones distintas de ácidos húmicos (AH), llamadas AH libres (estabilizados bioquímicamente) y AH enlazados (estabilizados bioquímica y químicamente) mediante extracción secuencial con hidróxido de sodio y pirofosfato sódico tras 90 y 150 días de incubación. Los AH se caracterizan mediante análisis termogravimétrico, cromatografía de exclusión molecular (HPLC-SEC), espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y RMN de ¹³C en estado sólido (CPMAS-TOSS). Del análisis de los resultados se concluye que las enmiendas promueven la incorporación de estructuras de lignina modificada, carbohidratos y compuestos de nitrógeno en la estructura de los AH libres y en menor extensión en la de los AH enlazados y aumentan la proporción de fracciones de elevado peso molecular. Se observa un incremento medio del 40% de carbono

no húmico en la fracción de carbono libre incluso tras 90 días de incubación bajo condiciones óptimas de mineralización. El incremento del carbono enlazado da lugar a un aumento medio de unos 0.7 Mg ha^{-1} de carbono húmico en los suelos enmendados. Este aumento es importante ya que contribuye a uno de los sumideros de carbono más inertes del suelo y puede representar un indicador útil para la estabilización de carbono en el suelo.

➤ Abstract:

The use of appropriate amendments derived from two-phase olive mill wastes (TPOMW) can represent a suitable option to maintain and restore C levels in agricultural soils under Mediterranean climates. We evaluated soil organic matter stabilisation pathways among different humic pools in a Calcaric Cambisol amended with 2% (40 Mg ha^{-1}) of TPOMW composting mixtures of different composition and at different degrees of stabilisation: starting mixture, after 14 weeks of composting (thermophilic stage) and after 30 weeks (mature compost). Non-humified soil organic C and two different fractions of humic acids (HA), namely free HA (biochemically stabilised) and bound HA (biochemically and chemically stabilised) were obtained by sequential extraction with NaOH and alkaline $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ after 90 and 150-days incubation. HA were characterised by thermal analysis, size exclusion chromatography (HPLC-SEC), FTIR and ^{13}C CPMAS-TOSS NMR. Amendments promoted incorporation of altered lignin structures, carbohydrate moieties and N-containing compounds into free HA and to a lesser extent into the bound HA, and increased the proportion of high MW fractions. There was an average increase of 40% for non-humic C in the free C fraction even after 90 days of incubation under optimum conditions for mineralisation. Augmentation of bound C resulted in an average increase of about 0.7 Mg ha^{-1} of humic C in amended soils. This increase is important as it contributes to one of the more inert soil C pools and could represent a useful indicator for soil C stabilisation.

IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES



El objetivo global de esta memoria es evaluar el impacto ambiental del uso agrícola del alperujo, desde su transformación y estabilización mediante compostaje hasta su uso final como enmienda orgánica. Las propiedades físico-químicas particulares del alperujo resultan favorables para conseguir la estabilización de carbono orgánico en el suelo a largo plazo: alto contenido en MO de naturaleza lignocelulósica, baja disponibilidad de nitrógeno y la presencia de polifenoles, características que limitan la velocidad de descomposición de la MO del alperujo en el proceso de compostaje y tras su aplicación al suelo y al mismo tiempo favorecen los mecanismos de humificación durante la transformación de la MO. Por tanto, es de esperar que estas características, que determinan la transformación de este residuo tanto durante el compostaje como una vez añadido al suelo, también afecten al impacto ambiental desde el punto de vista de la conservación de carbono y las emisiones de GEI.

Con la finalidad de estudiar de forma global el impacto del uso agrícola del alperujo se ha secuenciado el estudio en cuatro capítulos. En el primer capítulo de la parte experimental (Capítulo 3) se investiga el efecto de la composición lignocelulósica del alperujo sobre la transformación y la degradación de la MO durante su compostaje. Para ello, se realiza el seguimiento del proceso de compostaje del alperujo en cuatro pilas de distinta composición química inicial: mezclas TS, DTS, THU y TOS. La preparación de las pilas así como las características físico-químicas de los materiales orgánicos empleados se describen con detalle en el Anexo I (Apartados I.1 a I.3).

Todas las mezclas se caracterizan en su composición por una elevada concentración inicial en lignocelulosa, especialmente la mezcla TOS preparada con restos de poda como agente estructurante (Capítulo 3, tabla 1). La evolución de la temperatura, de la humedad (Capítulo 3, figura 2) y de los índices de estabilidad y madurez convencionales (Capítulo 3, figuras 5 y 6), refleja el correcto desarrollo del proceso y las diferentes fases de estabilización de la MO. En los compost maduros, la MO alcanza un grado de humificación similar y muy elevado en todos los casos.

La duración del proceso de compostaje varía entre 34 y 36 semanas, lo que contrasta con los periodos registrados para otros residuos orgánicos como los lodos de depuradora, los residuos sólidos urbanos e incluso el alpechín, cuyo compostaje dura entre 12-16 semanas. A pesar de la larga duración del proceso, la cantidad de MO degradada es relativamente baja en las cuatro pilas. Se registran pérdidas de MO de sólo el 30-35% del contenido inicial (Capítulo 3, figura 1), con la excepción de la mezcla THU, preparada con urea y caracterizada por una mayor concentración de nitrógeno mineral, fácilmente disponible para los microorganismos, en la que se degrada hasta el 50% de la MO original y se reduce la duración del compostaje a 27 semanas. En todos los demás casos, los porcentajes de MO degradada son inferiores a los típicos registrados tras el compostaje de una gran variedad de residuos orgánicos, en los que las pérdidas de carbono representan normalmente entre el 52-74% de la cantidad de carbono inicial. Incluso en el alpechín, la cantidad de MO degradada tras un proceso de compostaje se encuentra entorno al 60% de la cantidad inicial.

Durante el compostaje de alperujo, la composición química inicial de las pilas determina el comportamiento de las pérdidas de MO desde el punto de vista cinético. Los valores de los parámetros derivados del ajuste de las curvas correspondientes a las pérdidas de MO (Capítulo 3, tabla 2), reflejan el efecto de los materiales utilizados en la elaboración de las pilas. Las mezclas DTS y TOS siguen una cinética lineal: en la primera de ellas debido a la baja concentración de sustancias hidrosolubles presentes en el alperujo seco y en el segundo caso debido a la mejora proporcionada por el agente estructurante (restos de poda) en la estructura de la pila. Por el contrario, en las mezclas TS y THU la descomposición de la MO evoluciona de forma exponencial debido a la rápida mineralización de compuestos lábiles durante las primeras semanas.

La presencia de fuentes de carbono y/o nitrógeno fácilmente disponibles para los microorganismos intensifica la degradación de MO hidrosoluble y de la holocelulosa al inicio del compostaje en las mezclas THU y TOS. La degradación de la fracción lignocelulósica (Capítulo 3, figura 3) es intensa en la mezcla THU debido fundamentalmente a la descomposición de hemicelulosa y celulosa por los microorganismos, cuya actividad se ve muy favorecida en esta pila preparada con nitrógeno mineral. La holocelulosa también se degrada de

forma intensa en la mezcla TOS debido, en este caso, al aumento de la actividad microbiana como consecuencia de la mejora en la aireación y de la introducción de una gran concentración de carbono hidrosoluble con los restos de poda.

Al final del proceso de degradación, el contenido en lignina es similar en ambas pilas, THU y TOS. Sin embargo, la comparación de los parámetros cinéticos entre TOS y TS muestra la ralentización del proceso de descomposición de la MO en la primera debido a la dificultad de los microorganismos para degradar su mayor contenido en lignina.

La composición inicial de las pilas también afecta a la evolución de los índices de humificación durante las primeras semanas del proceso de compostaje (Capítulo 3, figuras 5 y 6). La degradación sucesiva de la hemicelulosa y la celulosa, así como de los carbohidratos y fenoles hidrosolubles, va acompañada de un aumento progresivo en el grado de polimerización de todas las mezclas, reflejando la participación de estos compuestos, presentes inicialmente en la mezcla o producidos durante la degradación de la fracción lignocelulósica, en la formación de moléculas más complejas con características húmicas. La buena calidad de los compost obtenidos queda demostrada por los altos índices de germinación y humificación que se alcanzan en las cuatro pilas.

En el cuarto capítulo se analiza el efecto de la composición química de las mezclas y de la fuente de nitrógeno utilizada sobre la concentración de los GEI CO_2 , CH_4 y N_2O emitidos a la atmósfera durante el compostaje de alperujo.

Para la cuantificación de los gases se preparan las mismas mezclas arriba descritas (correspondientes al Capítulo 3), con las mismas proporciones iniciales, más otra nueva utilizando restos de poda como agente estructurante y urea como única fuente de nitrógeno: mezcla TOU.

Las cinco pilas muestran una evolución similar y típica del compostaje de alperujo, manteniendo una fase termófila muy activa con temperaturas elevadas (50-70°C) durante 10 semanas sin que esto conlleve una gran pérdida total de carbono, y con una duración total del proceso de unas 30 semanas (Capítulo 4, tabla 1, figura 2). En este caso, es la mezcla TOU la que experimenta la degradación más intensa de la MO, especialmente al inicio del

proceso, como consecuencia de la gran cantidad de MO fácil de degradar, aportada por los restos de poda y de la disponibilidad de nitrógeno mineral obtenido por los microorganismos a partir de la hidrólisis de la urea. Los valores de pH son ligeramente alcalinos en todas las mezclas iniciales, algo inferiores en la mezcla TOU (pH 7,81), con urea como única fuente de nitrógeno, que en el resto de las mezclas preparadas con estiércol como fuente de nitrógeno (pH 8,35-8,80). En las pilas preparadas con urea (TOU y THU), el pH disminuye ligeramente durante la etapa de maduración debido a la nitrificación. A continuación se discuten los resultados más interesantes obtenidos en la medición de los gases CO₂, CH₄ y N₂O en las cinco pilas anteriormente descritas:

Como se exponía en la introducción de esta memoria (Capítulo 1), las emisiones de CO₂ no se tienen en cuenta al evaluar el impacto medioambiental de las operaciones de compostaje. La evolución de las emisiones de CO₂ (Capítulo 4, figura 3a) fue muy similar en las cinco pilas, detectándose los mayores picos de producción durante la fase termófila (altas temperaturas e intensa actividad microbiana) y reflejando el alto grado de estabilidad alcanzado en todos los casos en los compost maduros.

En cuanto a las emisiones de metano registradas en la superficie de las cinco pilas (Capítulo 4, figura 3b), los valores que se detectan son relativamente bajos dentro del intervalo común de flujos de CH₄ medidos en pilas de compostaje de diferentes residuos orgánicos, como estiércoles o RSU. El motivo principal es la baja velocidad de producción de metano relacionada con las características del alperujo y no debido a problemas de difusión o transporte del gas desde el interior de las pilas, ya que estas se voltean periódicamente como corresponde a un proceso de compostaje bien controlado.

En el estudio se observa que las emisiones de CH₄ dependen de la velocidad de degradación de la MO y de la composición inicial de las mezclas. Las mezclas en las que la degradación de la MO sigue una cinética exponencial (TS y TOU) producen picos máximos de CH₄ de hasta 100 g C-CH₄ m⁻² d⁻¹ durante las primeras seis semanas del proceso, cuando grandes cantidades de nutrientes y compuestos orgánicos fácilmente disponibles

estimulan el crecimiento microbiano, reduciendo los niveles de oxígeno en la pila y facilitando la creación de puntos anaerobios. Estos picos de producción de metano van acompañados de incrementos en la concentración de CO₂ como consecuencia de la obtención de una mezcla de ambos gases como producto final en la metanogénesis (Capítulo 4, figura 3). En el resto de mezclas (DTS, TOS y THU), con una cinética de descomposición prácticamente lineal debido a la baja velocidad de degradación de la MO al inicio del proceso, los flujos de CH₄ durante las primeras semanas se mantienen en general inferiores a 50 g C-CH₄ m⁻² d⁻¹. En todos los casos, transcurridas 10 semanas ya no se detectan concentraciones significativas de metano en la superficie de las pilas. En este punto la actividad de los microorganismos es menor al haber agotado la mayor parte de los compuestos fácilmente biodegradables por lo que hay mayor disponibilidad de oxígeno en la pila.

Respecto a la composición inicial de las mezclas, el uso de los estiércoles de oveja y caballo en las pilas TS, DTS, TOS y THU, da lugar a mayores flujos de metano durante las primeras cinco semanas de compostaje que los encontrados en la pila preparada sin estiércol (TOU), lo cual indica que pudo haber incorporación de microorganismos anaerobios con el estiércol. En la pila TOU, a pesar de su mayor velocidad de descomposición, los mecanismos de degradación anaerobia de la MO ocurren de forma muy lenta al inicio del proceso, hasta la octava semana aproximadamente en la que se detecta el pico de producción de metano en esta mezcla. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de una escasa cantidad de bacterias metanógenas en la mezcla inicial, microorganismos que necesitan entre seis y ocho semanas para colonizar la pila. También cabe la posibilidad de que los altos niveles de amoníaco generados al inicio del proceso en esta pila, por la hidrólisis de la urea, inhiban el crecimiento de las bacterias metanógenas, lo cual ocurre especialmente en medios con pH superiores a nueve. Sin embargo, este mecanismo inhibitorio causado por la presencia de elevadas concentraciones de amoníaco no habría sido determinante en la pila THU, preparada con urea y estiércol de caballo, en la que los niveles de metano son sólo ligeramente inferiores a los del resto de pilas preparadas con estiércol, a pesar de que las cantidades de amoníaco detectadas durante las primeras seis

semanas de compostaje superan a las de la pila TOU y presenta también valores de pH más elevados.

Las emisiones de N_2O durante el compostaje de alperujo dependen fundamentalmente de la velocidad de degradación de la MO y de la presencia de urea como fuente de nitrógeno en la mezcla inicial (Capítulo 4, figura 4). Los niveles detectados sobre la superficie de las pilas varían entre 0-0,9 g N- N_2O $m^{-2} d^{-1}$, en las pilas preparadas sin urea (TS, DTS y TOS), hasta picos de 1,2 y 3,7 g N- N_2O $m^{-2} d^{-1}$, medidos en las pilas TOU y THU, respectivamente.

La mayor producción de este gas se concentra durante la segunda mitad de la etapa termófila, entre las semanas 6 y 17. Al comparar la evolución de las distintas formas de N mineral, NH_4^+ y NO_3^- , junto con las emisiones de N_2O durante el compostaje (Capítulo 4, figura 4), se observa que los picos de producción de este gas tienen lugar durante las semanas en las que la nitrificación (oxidación biológica del amoníaco a nitrato) es más intensa (durante las semanas 10 y 15), lo cual señala a la nitrificación como mecanismo principal responsable de la emisión de N_2O durante el compostaje de alperujo.

En las últimas semanas del proceso, se podría esperar la producción de N_2O debido a que la concentración de nitrato en las pilas es mayor y los volteos hacen posible que los nitratos (o nitritos) puedan situarse en zonas del interior de las pilas donde la temperatura es superior y la concentración de oxígeno inferior a las de la superficie. Estas condiciones favorecen la reducción del NO_3^- a N_2 mediante la desnitrificación y la emisión de N_2O como producto intermedio de este mecanismo. Sin embargo, durante el compostaje de alperujo, los niveles de producción de N_2O tras la nitrificación no son significativos en ninguna de las cinco pilas. Esto sugiere que los microorganismos desnitrificantes, bacterias predominantemente heterótrofas, no encuentran el medio óptimo para crecer debido principalmente a la escasez de fuentes de carbono fácilmente disponible en la fase de maduración, en la que por el contrario, se intensifican los procesos de humificación de la MO relacionados con el alto contenido en lignina del alperujo (Capítulo 3).

Aunque las concentraciones de N_2O detectadas son bajas y se encuentran dentro del intervalo común de flujos de N_2O encontrados en pilas de compostaje de diferentes residuos orgánicos, los niveles máximos

encontrados en las pilas preparadas con urea son similares e incluso superiores a los generados durante el compostaje de materiales ricos en nitrógeno, e incrementan el impacto ambiental del compostaje de alperujo.

El quinto capítulo evalúa el efecto de la fracción lignocelulósica del alperujo sobre la dinámica de mineralización del carbono en suelos enmendados, indicativa de la estabilidad microbiana y de la permanencia del carbono añadido. El estudio se realiza en suelos enmendados con las mezclas de compost de alperujo descritas en el tercer capítulo. Las mezclas se adicionan con diferente grado de estabilidad (correspondientes a las fases inicial, termófila y de maduración del proceso de compostaje) lo cual es de utilidad para evaluar la práctica que maximiza la cantidad de carbono inmovilizado. La dosis adicionada es equivalente a 40 Mg ha^{-1} .

La dinámica de mineralización del carbono en los suelos enmendados se ve afectada tanto por el grado de estabilidad de las mezclas como por su composición inicial y, en especial, por la fracción lignocelulósica del alperujo. Así, se observa como la adición de las muestras menos transformadas de las mezclas THU (preparada con urea) y TOS (con restos de poda de olivo como agente estructurante) origina las mayores velocidades de mineralización durante las dos primeras semanas de incubación, en cada uno de los suelos enmendados (Capítulo 5, figura 1). En el primer caso, el efecto se atribuye a una mayor riqueza microbiana en la muestra, como consecuencia de la disponibilidad de nitrógeno mineral durante el compostaje. En el segundo caso, al mayor contenido en holocelulosa y compuestos hidrosolubles de la muestra, fácilmente disponibles para los microorganismos, proporcionados por los restos de poda. A excepción de estos dos tratamientos, el resto (las muestras correspondientes al inicio del compostaje de las pilas TS y DTS y el conjunto de muestras de mayor grado de estabilidad), no provocan diferencias significativas en la velocidad de mineralización del carbono añadido, al igual que se observó durante el compostaje (Capítulo 3). Como muestra el análisis de componentes principales (Capítulo 5, figura 3) las enmiendas más estabilizadas, sin que influya su composición, se agrupan dentro del cuadrante dominado por la relación lignina/holocelulosa y por el índice de humificación, claramente diferenciadas de los puntos iniciales de las mezclas THU y TOS. Es

decir, una vez degradadas las fracciones de carbono y nitrógeno fácilmente disponibles, la velocidad de mineralización del carbono añadido con las distintas enmiendas está limitada por la fracción lignocelulósica del alperujo.

Los valores obtenidos de los parámetros cinéticos C_0 (porcentaje de carbono potencialmente mineralizable), k (constante de velocidad), C_R y C_S (porcentajes de carbono mineralizable de las etapas rápidas y lenta, respectivamente, del modelo combinado), en los numerosos ajustes realizados (Capítulo 5, tablas 2, 3 y 4), son consistentes con la composición y el grado de estabilización de las enmiendas. Cabe destacar que, en todas las mezclas iniciales, más de la mitad del carbono potencialmente mineralizable es carbono biológicamente resistente a la degradación, lo que es una muestra de la baja degradabilidad del alperujo, como consecuencia de su alto contenido en lignina.

En este capítulo se incluye un balance global de carbono para evaluar, de forma completa, la eficiencia de la estabilización en el suelo del carbono añadido con las enmiendas (Capítulo 5, tabla 5). En este análisis se recogen las pérdidas de carbono ocurridas durante el compostaje de alperujo (Capítulo 3) y tras la aplicación al suelo de las mezclas descritas en este capítulo. Se realiza un análisis comparativo suponiendo el mismo tiempo total de descomposición (compostaje + suelo) para todas las muestras.

En el caso del alperujo se observa un comportamiento particular: las muestras más estabilizadas originan mayores pérdidas totales de carbono que las mezclas iniciales. Este efecto se debe principalmente a la lenta velocidad de degradación de las enmiendas de alperujo en el suelo, que sólo mineralizan hasta un 21% del carbono añadido tras 39 semanas de incubación, mientras que otros residuos orgánicos típicos habrían mineralizado la misma cantidad de carbono en solo 8-10 semanas de incubación.

Las pérdidas totales de carbono calculadas para las mezclas de compost de alperujo son mucho menores que las observadas para una gran variedad de compost de diferentes residuos orgánicos, incluyendo el alpechín. Además, en el caso de los compost de alperujo, las pérdidas totales de carbono no están afectadas significativamente por el grado de estabilización de las mezclas, exceptuando los suelos enmendados con las mezclas iniciales, en el que las pérdidas de carbono son significativamente inferiores a las de las

mezclas más transformadas debido al corto periodo de compostaje en las primeras. Como consecuencia, la adición al suelo de cualquiera de las mezclas de compostaje de alperujo, con excepción de los puntos iniciales, tendría un efecto similar en la eficiencia de conservación de carbono en el suelo. Desde un punto de vista práctico, esto permite acortar el tiempo de compostaje hasta el mínimo requerido para asegurar la higienización del material y un grado de estabilidad adecuado, que evite cualquier efecto fitotóxico. De acuerdo con la información aportada en el capítulo 3, los datos obtenidos para el índice de germinación muestran que no existe ningún efecto fitotóxico tras 15 semanas de compostaje para todas las mezclas. Los índices de humificación indican, a su vez, que las mezclas habrían alcanzado un adecuado grado de estabilización.

La evaluación de la eficiencia en la conservación de carbono derivada del uso de las mezclas de compost de alperujo confirma el interés del reciclaje de este residuo como enmienda orgánica para promover la estabilización de carbono orgánico a largo plazo. Las dinámicas de mineralización descritas en este estudio prueban la baja velocidad de mineralización en el suelo para una gran variedad de mezclas de alperujo de diferente composición. La composición lignocelulósica del residuo se identifica como factor clave que gobierna la dinámica de degradación en el suelo. Estos resultados, obtenidos de experiencias de incubación en condiciones controladas, son de gran ayuda en la optimización de experiencias de campo dirigidas a maximizar un eficiente secuestro de carbono.

El sexto capítulo se centra en los mecanismos de estabilización del carbono en suelos enmendados. Para ello, se examinan los cambios cualitativos y cuantitativos ocurridos en distintas fracciones de carbono húmico. El estudio se realiza con las mezclas de compost de alperujo TS, THU y TOS, descritas en el tercer capítulo. Éstas se adicionan al suelo con diferente grado de estabilidad (mezcla inicial, termófila y compost maduro), lo cual es de utilidad para evaluar la práctica que maximiza la cantidad de carbono inmovilizado. La dosis adicionada es equivalente a 40 Mg ha⁻¹.

El suelo enmendado se incubó durante cinco meses bajo condiciones óptimas para la mineralización (temperatura: 25°C, humedad: 40% de la

capacidad de retención hídrica del suelo). Bajo estas condiciones y de acuerdo con el modelo RothC de secuestro de carbono, los periodos de incubación adoptados para la toma de muestra (90 y 150 días) corresponden, respectivamente, a una experiencia de más de un año en condiciones de campo, en regiones mediterráneas frías o secas (90 días) o con clima templado y húmedo (150 días).

En el capítulo 6 (figura 1) y en el Anexo II (Apartado II.4) de esta memoria se describe con detalle el procedimiento de extracción seguido para la obtención de las fracciones de carbono orgánico extraíble (C_{EXT}) “libre” y “enlazada”, así como para la separación de las sustancias húmicas de estas fracciones y la obtención de los correspondientes ácidos húmicos. Las fracciones de carbono orgánico se obtienen mediante extracción secuencial: la primera fracción se obtiene por extracción con NaOH y se compone principalmente de MO no humificada y MO humificada o estabilizada bioquímicamente, sin estar químicamente enlazada a los constituyentes minerales del suelo. Por este motivo se llama a esta primera fracción “libre”. La extracción del residuo que queda de la extracción anterior con pirofosfato sódico consigue la disolución de complejos organometálicos y se obtiene parte del carbono estabilizado químicamente. Esta es la fracción llamada “enlazada”. De estas dos fracciones se separan las sustancias no húmicas de las húmicas, y se separan los ácidos húmicos de los fúlvicos. A continuación se discuten los resultados obtenidos:

En cuanto a las diferencias encontradas en el contenido total de carbono y nitrógeno de los suelos enmendados respecto al suelo control (Capítulo 6, tabla 2), la adición de las enmiendas causa en todos los casos un aumento significativo de ambos parámetros, cuya magnitud se ve afectada por la composición química de las mezclas de compost empleadas (TS, THU y TOS).

El alto contenido de MO de la mezcla TOS, rica en compuestos de carbono hidrosolubles, lípidos, celulosa y hemicelulosa, proporcionados en gran parte por los restos de poda (Capítulo 3), mantiene los niveles de carbono y nitrógeno totales en los suelos enmendados significativamente superiores a los del resto de tratamientos y suelo control. El grado de estabilidad de las

mezclas de compost utilizadas (inicial, termófilo y compost maduro) no produce diferencias significativas.

El contenido de C_{EXT} libre y enlazado, también aumenta significativamente en los suelos enmendados respecto al suelo control, incluso tras cinco meses de incubación (Capítulo 6, figura 2). Este resultado sugiere que, con la dosis utilizada de enmienda orgánica (40 Mg ha^{-1}), el compost de alperujo consigue inducir cambios en la composición de la fracción húmica del suelo que perduran con el tiempo.

En la fracción de C_{EXT} libre, destaca el incremento en las formas de carbono no húmico, cuyo contenido aumenta un 40% de media en los suelos enmendados respecto al suelo control. A su vez, el grado de estabilización de las enmiendas afecta significativamente a la cantidad de carbono no húmico encontrada en esta fracción: las mezclas iniciales, poco transformadas, aportan mayor cantidad de formas de carbono lábil, superior al resto de tratamientos.

En cuanto a la composición de las mezclas de compostaje, las muestras de la mezcla TOS (inicial, termófila y compost maduro), rica en lignocelulosa y MO lábil, aumentan de forma significativa el contenido de carbono húmico y no húmico de la fracción de C_{EXT} libre, en el suelo enmendado.

En la fracción de C_{EXT} enlazado, al contrario que en la fracción anterior, los cambios más significativos se encuentran en el contenido de carbono húmico, el cual aumenta entre un 22-30% de media en los suelos enmendados respecto al control. En este caso, no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos en función del grado de descomposición de las enmiendas o de su composición química. En esta fracción, se observa un incremento medio en la cantidad de carbono húmico de los suelos enmendados de $0,7 \text{ Mg ha}^{-1}$. Este aumento tiene importantes implicaciones en la estabilización de carbono orgánico ya que se produce en una de las fracciones más inertes o recalcitrantes de la MO del suelo y puede ser por tanto un indicador de los procesos de secuestro de carbono en el suelo.

A continuación, la discusión se centra en los cambios producidos en la estructura química de los ácidos húmicos (AH) obtenidos a partir de las fracciones de carbono húmico, libre y enlazada, descritas en el párrafo anterior. Los AH se caracterizaron mediante análisis elemental, termogravimetría,

espectroscopía de infrarrojos FT-IR, cromatografía de filtración en gel (HPLC-SEC) y resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C) de sólidos.

Los análisis realizados confirman diferencias estructurales entre los AH de ambas fracciones, además de las existentes entre los AH del suelo control y los extraídos de los suelos enmendados. Los resultados (Capítulo 6, tablas 3 y 4), reflejan fundamentalmente que los AH de la fracción enlazada contienen mayor proporción de estructuras aromáticas, mayor contenido en carbono y menor en nitrógeno, que los AH de la fracción libre. Así mismo, se observa la persistencia de componentes más lábiles o de menor estabilidad térmica en la estructura de los AH de los suelos enmendados respecto a los del suelo control, lo que refleja la incorporación de MO humificada de las mezclas de compost, de naturaleza menos recalcitrante que la de los AH naturales, a la estructura de los AH del suelo. En los AH de los suelos enmendados también se encuentra un aumento en la proporción de fracciones de elevado peso molecular respecto al suelo control (Capítulo 6, figura 3).

El análisis por RMN- ^{13}C muestra con más detalle las diferencias en la estructura de los AH (Capítulo 6, figura 4, tablas 5 y 6). Los espectros muestran el predominio en la estructura de los AH de un esqueleto de carbono alquílico formado por largas cadenas de polimetileno ($-\text{CH}_2-$). En los espectros de la fracción libre se aprecia también la existencia de átomos de carbono cuaternario, lo que indica la presencia de cadenas de alquilo muy ramificadas. Este esqueleto carbonado, característico de la estructura de los AH, puede haberse formado por la oxidación y polimerización de lípidos de bajo peso molecular y puede ser el precursor de formas de carbono estable y recalcitrante en el suelo. Otra característica de los espectros de RMN- ^{13}C de AH es la presencia de átomos de carbono de grupos metoxilo ($-\text{OCH}_3-$) de hemicelulosas y lignina. La intensidad relativa a esta señal aumenta en los espectros de los AH de los suelos enmendados respecto a los del suelo control como consecuencia de la incorporación de unidades de lignina correspondientes a las mezclas de compost.

Uno de los resultados más relevantes es la aparente estabilización bioquímica, a través de procesos de humificación, de formas de carbono lábil en la estructura de los AH de la fracción libre. Los átomos de carbono de alcoholes alifáticos y de grupos éter, propios de los polisacáridos estructurales

(celulosa y hemicelulosas), producen señales con desplazamientos químicos de 50-110 ppm. En los espectros de los AH, esta región está dominada por una señal a 73 ppm cuya intensidad relativa es mayor en los espectros de los AH libres de los suelos enmendados. La señal se atribuye a átomos de carbono de anillos de carbohidratos de hemicelulosas o de complejos lignina-hemicelulosas añadidos al suelo con las mezclas de compost de alperujo. De todos los tratamientos destacan nuevamente, en cuanto a la intensidad relativa de esta señal, los AH de los suelos enmendados con la mezcla TOS en su fase inicial y termófila, lo que refleja una mayor proporción de grupos O-alquilo en la estructura de estos AH, a diferencia de los del resto de tratamientos.

La incorporación o protección de carbohidratos en la fracción de carbono húmico menos recalcitrante de estas muestras se confirma por una segunda señal a 63 ppm, presente de forma exclusiva en los espectros de los AH de los suelos enmendados con las mezclas TOS inicial y termófila. Esta señal corresponde, en las hemicelulosas, a los átomos de carbono C-6 (en las hexosas) y C-5 (en las pentosas).

Una evidencia más es la señal con desplazamiento químico de 103 ppm que se atribuye al átomo de carbono anomérico C-1 de los polisacáridos. Ésta señal no se observa en los espectros de los AH del suelo control y es más intensa en los espectros de los AH de los suelos enmendados con las mezclas TOS inicial y termófila, debido a la rica composición en lignocelulosa de estas mezclas de compost preparadas con restos de poda (Capítulo 3). Estos cambios estructurales persisten tras cinco meses de incubación.

La región de carbono aromático, que comprende desplazamientos químicos de 110-160 ppm, es la segunda en importancia en los espectros de RMN-¹³C de AH, después de la correspondiente al carbono alquílico. En esta región, las señales a 130 y 150 ppm corresponden a átomos de carbono aromáticos con sustituyentes y a átomos de carbono fenólicos de la lignina. En general, los espectros de AH del suelo control y de la fracción enlazada contienen en su estructura mayor proporción de carbono aromático que los AH libres, como ya mostraban los resultados de los análisis térmico y de espectroscopía FT-IR. Así mismo, la relación entre la proporción relativa de carbono de grupos O-alquilo y la de carbono aromático muestra un aumento en la complejidad estructural de los AH libres durante la incubación así como el

mayor grado de estabilidad de los AH enlazados. Los AH enlazados poseen también en su estructura mayor proporción de átomos de carbono de grupos carboxilo, carbonilo, y amida que los AH libres.

Los resultados obtenidos, expuestos detalladamente en esta memoria, cubren los objetivos que se marcaron al inicio del trabajo. A parte de las conclusiones específicas de cada capítulo, se obtienen las siguientes conclusiones globales:

1. En el compostaje de alperujo se demuestra que la biodegradación de la MO depende de las características originales del residuo, de su composición lignocelulósica, y de la disponibilidad del nitrógeno aportado. Del mismo modo, se encuentra que el alto grado de humificación en los compost finales se debe a la particular composición química del alperujo.
2. La composición lignocelulósica del alperujo así como la baja disponibilidad de nitrógeno disminuyen las emisiones de CO₂, CH₄ y N₂O durante el compostaje. Las emisiones de CH₄ están muy influenciadas por la presencia de estiércol en la mezcla inicial y las de N₂O por la fuente de nitrógeno, que puede aumentar el impacto ambiental del compostaje de alperujo como en el caso de la adición de urea en el proceso.
3. La idoneidad del compost de alperujo para promover la estabilización de carbono en el suelo a largo plazo se evidencia mediante la baja cantidad de carbono mineralizado en los suelos enmendados junto con la prevalencia de la fracción de carbono difícil de degradar, incluso en las mezclas iniciales poco transformadas.
4. La degradación en el suelo del alperujo seco (procedente del almacenamiento en balsa) tiene un comportamiento similar al de las mezclas más transformadas de alperujo fresco. Esto refleja que la

fracción lignocelulósica del alperujo gobierna su dinámica de degradación en el suelo, al igual que se observó durante el compostaje.

5. Los cambios observados en las diferentes fracciones de carbono húmico en los suelos enmendados demuestran la incorporación de componentes de la fracción lignocelulósica del alperujo a las formas de carbono más inertes del suelo, quedando protegidas frente a la mineralización.
6. La incorporación de poda en el compostaje favorece la estabilización bioquímica de compuestos de carbono lábiles (holocelulosa, fracciones de carbono hidrosoluble y soluble en álcali) en la fracción húmica del suelo.
7. El uso de compost de alperujo como enmendante orgánico resulta eficaz en la estrategia de estabilizar carbono en el suelo a largo plazo. Hay un beneficio neto al final del proceso dada la resistencia del material a la degradación durante su compostaje (no se degrada más del 50% de la MO inicial) y la baja mineralización de carbono tras su aplicación al suelo. A esto se suma el escaso impacto ambiental de su compostaje evaluado mediante la emisión de GEI.
8. El diseño experimental en el estudio de los procesos de humificación se hizo de acuerdo al modelo RothC de secuestro de carbono. Los resultados pueden ser utilizados en el futuro en la optimización de experiencias de campo dirigidas a secuestrar carbono en los suelos del propio olivar.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS



V.1. MATERIALES

1.1 *Materiales orgánicos empleados.*

Los materiales orgánicos empleados, tanto el alperujo como los subproductos agrícolas seleccionados para su compostaje, se obtuvieron de la finca experimental *Venta del Llano* perteneciente al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) en Mengíbar (Jaén), donde también se elaboraron las pilas de compostaje en planta piloto (Apartado V.1.2).

El alperujo utilizado fue de dos tipos: alperujo fresco (TPOMW, terminología inglesa: two-phase olive mill waste) y alperujo seco (D-TPOMW, terminología inglesa: dry two-phase olive mill waste). El alperujo fresco fue el producido en la almazara de la finca durante la primera campaña de molturación (primer año experimental), entre los meses de noviembre y marzo, mientras que el alperujo seco llevaba un año almacenado en balsa de desecación. Este sistema de biodegradación natural se usa tradicionalmente como etapa previa al tratamiento del residuo mediante compostaje, a su procesamiento por otros métodos como la cogeneración (producción de energía) o la digestión anaerobia, o como etapa final antes de deshacerse del residuo mediante incineración.

Los materiales sólidos agrícolas seleccionados para compostar con el alperujo fueron:

- Restos de poda de olivo, como agente estructurante.
- Estiércoles de caballo y de oveja, como fuente de nitrógeno.

También se utilizó en algunos casos urea como fuente de nitrógeno mineral.

Se muestrearon y caracterizaron los alperujos y los tres materiales agrícolas. Las técnicas de muestreo se presentan en el Apartado V.1.3.

1.1.1. *Alperujos*

Se realizó un estudio de las características físico-químicas de los alperujos (tabla V.1).

TABLA V.1 Caracterización de los alperujos y de los materiales agrícolas seleccionados como agentes estructurantes y fuentes de nitrógeno.

Parámetro	Alperujo fresco	Alperujo seco	Restos de poda de olivo	Estiércol de oveja	Estiércol de caballo
Humedad (%)	59,5	35,9	36,7	48,8	41,0
MO (%)	86,4	65,5	91,0	41,6	51,8
C _{OT} (%)	47,4	32,5	44,4	21,6	26,4
N _T (g kg ⁻¹)	12,6	13,3	11,1	19,5	8,7
C _{OT} /N _T	37,8	24,5	39,9	11,1	30,3
pH	5,84	8,23	5,94	8,16	7,43
CE (dS m ⁻¹)	2,94	2,92	0,01	9,70	3,75
Lignina (%)	43,4	32,7	33,6	21,6	20,0
Hemicelulosa (%)	39,5	19,4	23,9	9,1	10,3
Celulosa (%)	18,8	20,4	28,5	9,5	24,4
C _{OH} (%)	8,6	3,4	9,9	2,0	1,2
Polifenoles (%)	1,1	0,6	1,3	0,2	0,1
Carbohidratos (%)	1,4	0,6	4,4	0,4	0,2
C _{EXT} (%)	18,8	7,9	15,8	6,4	3,8
C _{AH} (%)	11,6	5,4	14,6	5,3	3,1
C _{AF} (%)	7,2	2,5	1,2	1,1	0,7
P (g kg ⁻¹)	0,7	1,3	1,0	4,2	1,4
K (%)	0,9	1,5	0,3	2,6	1,1
Fe (mg kg ⁻¹)	1.570	4.015	630	5.355	6.250
Cu (mg kg ⁻¹)	22	28	42	49	21
Mn (mg kg ⁻¹)	37	47	44	215	181
Zn (mg kg ⁻¹)	24	37	13	71	45
B (mg kg ⁻¹)	153	259	36	349	149
Pb (mg kg ⁻¹)	7	13	8	---	17
Cd (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ni (mg kg ⁻¹)	64	90	88	61	49
Cr (total) (mg kg ⁻¹)	36	60	71	28	25

MO: materia orgánica; C_{OT}: carbono orgánico total; N_T: nitrógeno total; CE: conductividad eléctrica; C_{OH}: carbono orgánico hidrosoluble; C_{EXT}: carbono extraíble con álcali; C_{AH}: carbono de ácidos húmicos; C_{AF}: carbono de ácidos fúlvicos.

En el alperujo fresco, el contenido en materia orgánica (MO) y carbono orgánico total (C_{OT}) encontrado fue considerablemente alto (86,4% y 47,4%, respectivamente), así como los contenidos de lignina (43,4%), hemicelulosa (39,5%) y celulosa (18,8%), principales constituyentes de esta materia orgánica. Los valores de estos parámetros fueron del orden de los contenidos en los restos de poda, otro material lignocelulósico. El carbono extraíble en álcali (C_{EXT}), que contiene el carbono de los ácidos húmicos (C_{AH}) y fúlvicos (C_{AF}), constituyó otra de las fracciones orgánicas más importantes (18,8%) y la relación C_{OT}/N_T resultó elevada debido al bajo contenido en nitrógeno total (N_T) (12,6 g kg⁻¹) en este material. Con respecto al contenido en micronutrientes, destaca la abundancia de Fe y la ausencia de Cd. Se detectó la presencia de otros metales pesados como Pb y Ni, siempre por debajo de los límites superiores establecidos por la legislación española para fertilizantes (Real Decreto 824/2005, de 8 de julio).

Por comparación con los valores obtenidos para el alperujo fresco se comprobó la biodegradación sufrida por el alperujo seco. Se pudo verificar que se había producido una pérdida de MO y una concentración de los nutrientes como consecuencia de la pérdida de peso (tabla V.1). En cuanto a los componentes de la MO, la hemicelulosa fue el constituyente más degradado así como las fracciones de carbono orgánico hidrosoluble (C_{OH}) y C_{EXT} cuyas concentraciones se redujeron a más de la mitad, respecto a las encontradas en el alperujo fresco.

1.1.2. Agentes estructurantes y fuentes de nitrógeno.

Como se ha descrito en el Apartado 1.1, los materiales agrícolas seleccionados para proporcionar al alperujo una estructura física y composición química adecuadas para su correcto compostaje fueron restos de poda de olivo y estiércoles de oveja y caballo.

Los restos de poda estuvieron formados por la fracción más fina de la poda (no se utilizaron ramas de diámetros superiores a 8-10 cm, lo que se conoce como leña) y por las hojas. El análisis de este material (tabla V.1)

mostró, además de un alto contenido en MO de naturaleza lignocelulósica, una elevada concentración de compuestos orgánicos hidrosolubles (C_{OH} : 9,9%; carbohidratos: 4,4%; polifenoles: 1,3%). Los valores de N_T fueron bajos y la relación C_{OT}/N_T alta, ambos muy próximos a los encontrados en el alperujo fresco.

En los estiércoles de oveja y caballo, empleados como fuente de nitrógeno, la presencia de la paja procedente de la cama les proporcionó un valor estructurante adicional. La caracterización físico-química de estos estiércoles mostró valores de pH ligeramente alcalinos, típicos de estos residuos, y una conductividad eléctrica (CE) moderada en el estiércol de caballo y alta en el estiércol de oveja, más rico en sales y compuestos orgánicos solubles (tabla V.1).

El contenido en metales pesados (Cu, Ni, Pb, Zn y Cr) detectados en los tres materiales mezclados con el alperujo estuvo por debajo de los límites superiores establecidos según el Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes.

1.2. Proceso de compostaje.

La elaboración de las pilas se efectuó tomando como referencia la relación C_{OT}/N_T , cuyo valor idóneo para la proliferación de los microorganismos debe estar comprendido entre 25 y 35 en la mezcla inicial. Además se tuvieron en cuenta las características físicas del alperujo que, por su elevada humedad y escasa porosidad, hace que la estructura inicial de la pila constituya un punto clave en la iniciación del proceso de compostaje, ya que se necesita una textura que permita la aireación. La tabla V.2 muestra la composición de cada una de las mezclas así como la terminología empleada para su identificación.

En la primera campaña (primer año experimental), tras el análisis de los materiales a compostar y con el objetivo de obtener variabilidad en la composición química de las mezclas iniciales, se elaboró una primera pila (TS) con una relación 1:2 en peso seco de alperujo fresco y estiércol de oveja. Esta

TABLA V.2 Composición de las mezclas.

Terminología de la mezcla ^a	Composición ^b	Pila
TPOMW (T) + Sheep manure (S)	Alperujo fresco (33%) + Estiércol de oveja (67%)	TS
D-TPOMW (DT) + Sheep manure (S)	Alperujo seco (50%) + Estiércol de oveja (50%)	DTS
TPOMW (T) + Horse manure (H) + Urea (U)	Alperujo fresco (33%) + Estiércol de caballo (67%) + Urea (14 kg ton ⁻¹)	THU
TPOMW (T) + Olive tree prunings (O) + Sheep manure (S)	Alperujo fresco (20%) + Restos de poda (20%) + Estiércol de oveja (60%)	TOS
TPOMW (T) + Olive tree prunings (O) + Urea (U)	Alperujo fresco (30%) + Restos de poda (70%) + Urea (9 kg ton ⁻¹)	TOU

^a Terminología inglesa utilizada en los artículos científicos. Las letras entre paréntesis forman el acrónimo correspondiente a cada pila.

^b Proporciones en peso sobre materia seca.

es una mezcla típica empleada en las plantas de compostaje del sur de España. Se preparó una segunda pila (DTS) con alperujo seco y estiércol de oveja en la que se variaron ligeramente las proporciones anteriores por la menor humedad del alperujo seco y para ajustar la relación C_{OT}/N_T . La tercera pila (THU) se elaboró con alperujo fresco y utilizando una fuente de nitrógeno diferente, el estiércol de caballo. Esta pila fue enriquecida con urea como fuente de nitrógeno mineral debido al bajo contenido en N_T (8,7 g kg⁻¹) encontrado en el estiércol. Por último, se probó el efecto de la adición de un agente estructurante adicional, restos de poda de olivo, en una cuarta pila (TOS) en la que se sustituyó parte del alperujo fresco por este material. En la segunda campaña (segundo año experimental) se prepararon las mismas mezclas arriba descritas, con las mismas proporciones iniciales, más otra nueva (TOU) utilizando restos de poda de olivo como agente estructurante y urea como única fuente de nitrógeno.

Las pilas se dispusieron en forma trapezoidal (5 m de largo, 2 m de ancho en la base y 1 m de alto) conteniendo aproximadamente cinco toneladas cada una. Los composts se prepararon por el sistema de aireación de pila móvil

con volteos periódicos (figura V.1). Las pilas se voltearon cada dos semanas durante seis meses, lo que corresponde a 24 semanas de fase bio-oxidativa, y posteriormente se dejaron en reposo durante un periodo de maduración de dos meses. La humedad de las pilas se mantuvo en torno al 40-60% mediante riegos realizados durante los volteos. El seguimiento del proceso se realizó *in situ* mediante la toma diaria de la temperatura a 50 cm de profundidad, en puntos diferentes de cada pila. Las nueve pilas mostraron una evolución similar y típica del compostaje de alperujo.



Figura V.1 Detalle de los volteos realizados en la planta de compostaje.

La tabla V.3 recoge los puntos más representativos del proceso de compostaje en cada pila, seleccionados tras la observación de las gráficas de temperatura. Estos puntos corresponden a las mezclas utilizadas en las experiencias de mineralización (Parte Experimental: Apartado III.2.1) y humificación (Parte Experimental: Apartado III.2.4) de la MO en suelo.

TABLA V.3 Puntos críticos del proceso de compostaje de cada una de las pilas.

Puntos	Fase	Semanas de compostaje	
		1ª campaña	2ª campaña
I	Mezcla inicial	1	1
T1	Fase termófila	8	6
T2	Fase termófila	16	10
F	Final de la fase bio-oxidativa	24	17
M	Compost maduro	32	26

1.3. Muestreo y preparación de las muestras.

Se realiza un muestreo del alperujo generado durante la época de molturación en la Finca Experimental *Venta del Llano* (Jaén), entre los meses de noviembre y marzo, así como del alperujo seco, tras un año en balsa de desecación, y de los otros materiales agrícolas utilizados: estiércol de oveja, estiércol de caballo y restos de poda de olivo.

A lo largo del proceso se muestrean las pilas quincenalmente durante la fase termófila y al final del proceso. Tras los volteos se toman seis submuestras, de 1 kg aproximadamente, distribuidas a lo largo de toda la pila, se homogeneizan y se toman unos 4 kg de muestra representativa. Esta muestra se divide en tres submuestras homogéneas. Una parte se utiliza para la determinación de la humedad. Otra parte (250-500 g) se congela para el posterior análisis del nitrógeno en forma amónica. La otra submuestra (2-3 kg) se seca al aire y se muele hasta un tamaño inferior a 0,5 mm para realizar el resto de análisis químicos.

1.4. Suelos.

Los suelos se muestrearon a una profundidad de 0-20 cm de tres zonas agrícolas diferentes. Dos de ellos son suelos de olivar y pertenecen, uno a la finca experimental *Venta del Llano* en Mengíbar, Jaén (37° 56' 26,87" N y 3° 47' 9,36" O), y otro a la *Sociedad Agraria de Transformación Casa Pareja*, situada en el término municipal de Jumilla, al noroeste de Murcia (38° 29' 16,78" N y 1° 13' 39,79" O). Las características de los tres suelos se muestran en la tabla V.4. Los dos primeros tienen una textura franco-arenosa (Jaén) y arenosa (Jumilla), muy bajo contenido en MO (1,5 y 1,0%, respectivamente) y pH alcalino (8,61 y 9,09). El otro suelo se recogió en la finca experimental *Tres Caminos* perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en la provincia de Murcia (38° 6' 7,47" N y 1° 1' 57,62" O). Este es un suelo en barbecho durante más de diez años de textura franco-arenosa, pobre en MO (1,7%) y de pH alcalino (8,68).

Se toma una muestra representativa de suelo, de cada zona estudiada, a partir de diferentes submuestras recogidas aleatoriamente. Esta muestra se homogeniza y se seca al aire. Una vez seca se rompen los agregados con un rodillo y se pasa por un tamiz de 2 mm de luz de malla. De la fracción fina se obtiene la muestra media por el sistema de cuarteo y sobre esta se realizan los análisis respectivos.

TABLA V.4 Principales características de los suelos.

Propiedad	Suelo		
	Jaén	Jumilla	Santomera
Arena gruesa (%)	2,5	32,6	0,5
Arena fina (%)	68,0	55,2	75,0
Limo (%)	15,8	5,7	10,1
Arcilla (%)	13,7	6,5	14,4
CaCO ₃ total (%)	33,9	20,9	48,8
MO (%)	1,5	1,0	1,7
N _T (%)	0,20	0,13	0,16
pH	8,61	9,09	8,68
CE (dS·m ⁻¹)	0,186	0,272	0,164
P asimilable (mmol·kg ⁻¹)	0,39	0,48	0,93
K asimilable (meq·kg ⁻¹)	9,2	3,7	5,9
Na soluble (meq·kg ⁻¹)	3,9	1,9	1,9

MO: materia orgánica; N_T: nitrógeno total; CE: conductividad eléctrica.

V.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1. RESIDUOS ORGÁNICOS Y COMPOSTS

2.1.1. HUMEDAD (H)

Se determina como humedad el porcentaje de agua con respecto a la muestra húmeda, por diferencia de pesadas entre el material húmedo y seco a 105°C durante 12 horas.

2.1.2. RESIDUO A CALCINACIÓN (CENIZAS)

Se determina según el método de Navarro *et al.* (1991) tomando como cenizas el residuo obtenido de la calcinación de la muestra a 430°C durante 24 horas. El contenido en cenizas se expresa en porcentaje respecto de muestra seca.

2.1.3. MEDIDA DEL pH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE)

Se prepara un extracto acuoso 1:10 (p:v) y se agita mecánicamente durante dos horas. La medida del pH se realiza con un electrodo de vidrio CRISON modelo 2001.

En este mismo extracto, después de centrifugar a 4.000 rpm durante 20 minutos y filtrar con papel lavado a los ácidos, se determina la CE en un conductímetro CRISON modelo GLP 31.

2.1.4. CAPACIDAD DE CAMBIO DE CATIONES (CCC)

Se obtiene mediante saturación del complejo de cambio con bario y determinación del catión retenido por diferencia con un blanco (Lax *et al.*, 1986).

REACTIVOS:

- Agua exenta de CO₂.

Se hierve agua desionizada para eliminar el aire que está disuelto y, una vez fría, se satura de aire exento de CO₂ pasando una corriente de aire sintético a través de una disolución de NaOH al 10% y de un tubo con cal sodada.

- Disolución A de Mehlich (Mehlich, 1948).

Se disuelven 45 ml de trietanolamina en medio litro de agua exenta de CO₂ y se añade HCl 1:10 (v:v) hasta ajustar el pH a 8,1. Se enrasa el volumen a 1 L con agua exenta de CO₂. A continuación se prepara una disolución de BaCl₂ disolviendo 50 g de BaCl₂·2H₂O en 1 L de agua exenta de CO₂. Las dos disoluciones, la de trietanolamina y la de BaCl₂, se mezclan.

- Disolución B de Mehlich.

Se disuelven 25 g de BaCl₂·2H₂O en 2 L de agua exenta de CO₂.

- Sulfato amónico 0,5 M.
- Ácido clorhídrico 1:1 (v:v).
- Carbón activo.

PROCEDIMIENTO:

Se pesan, con precisión de 0,0001 g, 1 g de muestra y 2 g de carbón activo para retener las fracciones orgánicas de bajo peso molecular. Se colocan en un tubo de percolación con un filtro de membrana celulósica de 0,45 µm de diámetro de poro y se mezclan. Si se prevé que la muestra puede contener sulfatos se añaden 25 ml de agua exenta de CO₂ y se deja reposar durante dos horas, se filtra y se repite la operación con otras tres fracciones más de agua para eliminar los sulfatos presentes en la muestra. Si la muestra no contiene sulfatos no se realizan lavados, sólo se humecta durante una hora.

Se añaden 25 ml de disolución A de Mehlich, y se deja percolar a una velocidad de 10-12 gotas por minuto, recogiendo el percolado en un Erlenmeyer para vacío, al que se ha agregado 5 ml de HCl (1:1) para evitar la

carbonatación del bario de los reactivos. A continuación se añaden 25 ml de reactivo B de Mehlich, se deja percolar a la misma velocidad y se recoge en el mismo Erlenmeyer.

Se lava dos veces con 25 ml de agua exenta de CO₂ y una tercera con 75 ml, recogiendo siempre los percolados en el mismo Erlenmeyer. Paralelamente se prepara un blanco con 25 ml de reactivo A y 25 ml de reactivo B en un Erlenmeyer para vacío al que se han agregado 5 ml de HCl (1:1).



Figura V.2. Montaje diseñado para medir la CCC de los materiales orgánicos.

Todos los Erlenmeyer se calientan en una plancha hasta reducir el volumen a la mitad y entonces se añaden 15 ml de (NH₄)₂SO₄ 0,5 M, para precipitar el BaSO₄. Una vez fríos, se filtran los precipitados recogiendo el filtrado en un matraz aforado de 250 ml y se lava el precipitado con agua acidificada con HCl (1:1). El precipitado se incinera y calcina. De la diferencia de pesos de BaSO₄ en el ensayo en blanco y en el problema, se calcula la CCC mediante la expresión:

$$\text{CCC meq/100 g} = [(\text{BaSO}_4 \text{ del blanco} - \text{BaSO}_4 \text{ problema}) \times 856,9]$$

2.1.5. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (C_{OT}), NITRÓGENO TOTAL (N_T)

Se determina por el método de Navarro *et al.* (1991) de análisis elemental de carbono que se basa en la medida del anhídrido carbónico producido al

quemar la muestra a 1.020°C en un analizador elemental, previa destrucción de carbonatos. En el caso del nitrógeno total, se utiliza una trampa que retiene el CO₂.

REACTIVOS:

- Atropina
- Acido clorhídrico 1:20 (v:v).

PROCEDIMIENTO:

La muestra tamizada a 0,5 mm se muele en un molino de bolas de ágata hasta conseguir una completa homogeneización. Para C_{OT} se pesan de 1 a 2 mg, con precisión de 0,001 mg, en una cápsula de estaño. Se destruyen los carbonatos que puedan existir e interferir en la medida mediante la adición de unas gotas de una disolución de HCl 1:20 (v:v) y se deja secar en desecador. Para N_T se pesan de 2 a 3 mg de la muestra, con precisión de 0,001 mg. Las muestras se introducen en un analizador elemental, previamente calibrado con atropina, y se utiliza una trampa de CO₂.

2.1.6. CARBONO ORGÁNICO HIDROSOLUBLE (C_{OH})

Se determina el carbono orgánico extraído con agua desionizada en un analizador de carbono TOC.

REACTIVOS:

- Biftalato de potasio 10 g/L de carbono.

PROCEDIMIENTO:

Se extrae la muestra con agua desionizada en proporción 1:20 (p:v) durante dos horas. Se centrifuga a 4.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se filtra por una malla de fibra sintética.

Se prepara una recta patrón de 0 a 2 g/L de carbono con biftalato de potasio. Tras realizar la dilución adecuada de la muestra se introduce en el analizador de carbono TOC previamente calibrado con disoluciones patrón de biftalato de potasio.

2.1.7. CARBOHIDRATOS SOLUBLES

Se determina por el método de la antrona, descrito por Brink *et al.* (1959).

REACTIVOS:

- D(+) glucosa
- Disolución de antrona al 0,2% en H₂SO₄ concentrado. Debe estar recién preparada.

PROCEDIMIENTO:

Se realiza una extracción de la muestra con agua desionizada en la proporción 1:20 (p:v). Se agita mecánicamente durante dos horas, se centrifuga a 4.000 rpm y se filtra con malla.

Se prepara una recta patrón a partir de una disolución de 25 mg/L de glucosa. Se toman 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de esta disolución y se completan con agua destilada hasta obtener un volumen final de 5 ml.

Se toman 5 ml de extracto acuoso problema o de la disolución patrón y se le añaden 10 ml de disolución de antrona, se agita unos 15 segundos y se deja en reposo durante 15 minutos para que desarrolle el color. Después de este tiempo se mide la absorbancia de las disoluciones coloreadas a una longitud de onda de 625 nm y se determina la concentración de carbohidratos respecto a la recta patrón.

2.1.8. POLIFENOLES

Se determinan mediante una modificación del método Folin (Maestro-Durán *et al.*, 1991).

REACTIVOS:

- Carbonato sódico 20%.
- Reactivo Folin-Ciocalteu.
- Ácido caféico.

PROCEDIMIENTO:

Se realiza una extracción de la muestra con agua desionizada en la proporción 1:20 (p:v). Se agita mecánicamente durante dos horas, se centrifuga a 4.000 rpm y se filtra con malla.

Se prepara una recta patrón a partir de una disolución de 60 ppm de ácido caféico. En matraces aforados de 50 ml se añaden 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la disolución anterior, posteriormente se adicionan 2,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu, se agita y tras tres minutos se añaden 5 ml de una disolución de Na_2CO_3 20% y se lleva a enrase con agua desionizada. Estas disoluciones contienen 0, 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 y 6,0 ppm de ácido caféico.

A 0,5 ml del extracto acuoso problema, en matraces aforados de 50 ml, se adicionan 2,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu y 5 ml de carbonato sódico 20% como en la recta patrón y se lleva a enrase. Estas disoluciones y las de la recta patrón se dejan en reposo una hora y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 725 nm, calculándose la concentración de polifenoles respecto a la recta patrón.

2.1.9. CARBONO EXTRAÍBLE (C_{EXT})

Se determina el carbono extraído con una disolución de hidróxido de sodio (C_{EXT}) en un analizador de carbono TOC.

REACTIVOS:

- Hidróxido de sodio 0,1 M.
- Biftalato de potasio.

PROCEDIMIENTO:

Se realiza una extracción con hidróxido de sodio 0,1 M en la proporción 1:20 (p:v). Se agita mecánicamente durante cuatro horas, se centrifuga a 4.000 rpm durante 20 minutos y se filtra por malla sintética. Se procede del mismo modo que para la determinación del carbono orgánico hidrosoluble en el apartado II.1.6.

2.1.10. FRACCIONAMIENTO DEL CARBONO DE ÁCIDOS HÚMICOS (C_{AH}) Y FÚLVICOS (C_{AF})

Precipitación de los ácidos húmicos a $pH \leq 2$ en el extracto de hidróxido de sodio correspondiente al carbono extraíble (C_{EXT}) (Sánchez-Monedero *et al.*, 1996).

REACTIVOS:

- Ácido sulfúrico concentrado.

PROCEDIMIENTO:

Una vez obtenido el extracto de materia orgánica con hidróxido de sodio, se adiciona ácido sulfúrico concentrado hasta un $pH \leq 2$. Se deja en reposo a 4°C durante 24 horas para conseguir una completa precipitación de los ácidos húmicos. Estos se separan del sobrenadante (ácidos fúlvicos) por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 minutos y posterior decantación. En los ácidos fúlvicos,

se determina el carbono (C_{AF}) como se hace para el carbono extraíble (Apartado 2.1.6). El carbono de los ácidos húmicos (C_{AH}), se calcula por diferencia entre el carbono total extraíble y el carbono de ácidos fúlvicos. El resultado se expresa en porcentaje:

$$\%C_{EXT} = \%C_{AH} + \%C_{AF}$$

2.1.11. NITRÓGENO EN FORMA AMÓNICA ($N-NH_4^+$)

Se determina espectrofotométricamente la intensidad de coloración verde del complejo producido al reaccionar el ión amonio con salicilato de sodio en presencia de dicloroisocianurato de sodio como fuente de cloro, nitroprusiato de sodio como catalizador (Sommer *et al.*, 1992) y citrato de sodio como complejante de calcio y magnesio para evitar su precipitación como hidróxidos a valores de pH mayores de 12 (Kempers y Zweers, 1986).

REACTIVOS:

- Reactivo A (preparar diariamente):

Se disuelven 7,813 g de salicilato de sodio y 25 mg de nitroprusiato de sodio, y se enrasan juntos a 100 ml con agua desionizada.

- Reactivo B:

Se disuelven 4,0 g de hidróxido de sodio y 0,5 g de dicloroisocianurato de sodio, y se enrasan a 100 ml con agua desionizada (pH 13).

- Reactivo C:

Se disuelven 9,33 g de citrato de sodio, y se enrasan a 100 ml con agua desionizada.

- Cloruro de potasio 2 M.

- Sulfato de amonio 400 mg/L de nitrógeno amónico.

PROCEDIMIENTO:

Se realiza una extracción con cloruro de potasio 2 M sobre la muestra fresca en la proporción 1:20 (p:v). Se agita mecánicamente durante dos horas,

se centrifuga a 4.000 rpm durante 15 minutos y se filtra con papel lavado a los ácidos.

A partir de una de disolución de sulfato de amonio de 25 mg/L de nitrógeno en forma amónica, se obtiene una recta patrón de 5 a 25 mg/L de nitrógeno. Se toman 0,4 ml de muestra obtenida en la extracción con cloruro de potasio 2 M, o de las disoluciones patrón, y se añaden 1,6 ml de reactivo A, 6,4 ml de agua desionizada, 0,8 ml de reactivo B y 0,8 ml de reactivo C. Se mezcla bien y se deja en reposo en la oscuridad durante 45 minutos para un adecuado desarrollo del color. Pasado este tiempo, se mide en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 660 nm y se determina la concentración de amonio respecto a la recta patrón.

2.1.12. NITRÓGENO COMO NITRATOS (N-NO₃⁻)

Medida del nitrógeno en forma de nitratos en un cromatógrafo iónico HPLC.

PROCEDIMIENTO:

Se realiza una extracción de la muestra seca con agua desionizada en la proporción 1:20 (p:v) agitando mecánicamente durante dos horas. Se centrifuga a 4.000 rpm y se filtra con filtros de jeringa.

La muestra diluida en la proporción adecuada con agua desionizada, calidad HPLC, se inyecta en el cromatógrafo iónico previamente calibrado con una disolución de NaNO₃ recientemente preparada que contiene 6 ppm de NO₃⁻ y se obtiene lectura directa de la concentración en el extracto.

2.1.13. NITRÓGENO ORGÁNICO (N_{ORG})

Se obtiene por diferencia entre el nitrógeno total del apartado 2.1.5 y las formas inorgánicas (amonio y nitrato) de los apartados 2.1.11 y 2.1.12 respectivamente:

$$\%N_{\text{ORG}} = \%N_{\text{T}} - (\%N_{\text{NH}_4} + \%N_{\text{NO}_3})$$

2.1.14. LIGNINA KLASON

Se considera como lignina Klason el residuo insoluble que queda después de un ataque ácido de la muestra y se determina según la norma ANSI/ASTM. American National Standard Institute (1977a).

REACTIVOS:

- Ácido sulfúrico 72%.

PROCEDIMIENTO:

Se pesa 1 g de muestra (P_1), con precisión de 0,0001 g, en un vaso de precipitados de 100 ml. Se mezcla bien con 15 ml de H_2SO_4 72% y se deja reposar 12 horas. Se trasvasa el contenido del vaso a un matraz de 1.000 ml y se añaden 560 ml de agua desionizada para pasar de H_2SO_4 75% a H_2SO_4 3%.

Se ajusta un tubo refrigerante o condensador al matraz y se mantiene a ebullición durante cuatro horas en una manta calefactora, al cabo de las cuales se deja sedimentar el sólido y se filtra en una placa filtrante, secada en estufa a 105°C y pesada (P_2). El sólido filtrado se lava con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido, se seca en estufa a 105°C durante 12 horas y se pesa (P_3).

Se toman unos 100 mg del sólido seco y se calcinan en mufla a 430°C durante 24 horas, obteniéndose así su porcentaje en materia orgánica (MO_L). El contenido en lignina se calcula con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{(P_3 - P_2) \times (\% \text{MO}_L) \times 100}{P_1 \times (100 - \% \text{H})}$$

donde %H es el porcentaje de agua respecto a muestra seca al aire y molida.

2.1.15. HOLOCELULOSA

Al producto obtenido después de la deslignificación de la muestra se le llama holocelulosa y se determina según la técnica descrita por Browning, (1967).

REACTIVOS:

- Ácido acético glacial.
- Clorito sódico.

PROCEDIMIENTO:

Se pesan 2 g de muestra (P_1), con precisión de 0,0001 g, en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se añaden 63 ml de agua destilada. A la suspensión se le añaden 0,2 ml de ácido acético glacial y 0,6 g de clorito sódico. Se cubre con un vidrio de reloj y se introduce al baño maría (70-80°C), agitando de vez en cuando. Este proceso se repite dos veces más. Al finalizar la tercera hora, se coloca el Erlenmeyer en un baño de agua-hielo hasta que la temperatura baje a 10°C. Se filtra en placa filtrante, previamente pesada (P_2) y se lava con agua destilada hasta eliminación de la coloración amarilla. Posteriormente se lava con agua desionizada caliente, se deja secar a 60°C y se pesa (P_3).

Al sólido obtenido se le determinan los porcentajes de humedad (% H_H) y de materia orgánica (% MO_H) del mismo modo que en los apartados 2.1.1 y 2.1.2, respectivamente. El contenido de holocelulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{Holocelulosa} = \frac{(P_3 - P_2) \times (100 - \%H_H) \times (\%MO_H)}{P_1 \times (100 - \%H)}$$

donde %H es el porcentaje de agua con respecto a muestra seca al aire y molida.

2.1.16. CELULOSA

Se determina según la norma ANSI/ASTM D, American National Standards Institute, (1977b).

REACTIVOS:

- Hidróxido sódico 17,5%.
- Hidróxido sódico 8,3%.
- Ácido acético 10%.

PROCEDIMIENTO:

Se pesa 1 g de holocelulosa (P_1), secada al aire, con precisión de 0,0001 g, en un Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 5 ml de NaOH 17,5% mezclando con una varilla de vidrio. Cada cinco minutos se añaden 2,5 ml de NaOH, hasta consumir un total de 12,5 ml y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16,5 ml de agua destilada a 20°C para pasar de NaOH 17,5% a 8,3%, se mezcla bien y se mantiene durante una hora a temperatura ambiente.

Se filtra en placa filtrante de peso conocido (P_2) y se lava con 50 ml de NaOH 8,3% y posteriormente con agua desionizada. Se repite el lavado con NaOH y agua desionizada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7,5 ml de ácido acético 10% y se deja en contacto tres minutos. Se vuelve a conectar el vacío y se lava con agua desionizada hasta neutralidad del filtrado. Se seca a 105°C en estufa durante 12 horas y se pesa (P_3).

Se calcula el contenido en materia orgánica (% MO_C) del sólido obtenido, de acuerdo con el apartado 2.1.2 y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{(P_3 - P_2) \times (\%MO_C) \times (\% \text{Holocelulosa}) \times 100}{P_1 \times (\%MO_H) \times (100 - \%H_H)}$$

2.1.17. HEMICELULOSA

La holocelulosa se considera la suma de la hemicelulosa y la celulosa, por lo tanto el contenido en hemicelulosa es calculado por diferencia entre la holocelulosa y la celulosa.

2.1.18. ÍNDICE DE GERMINACIÓN (IG)

Se determina de acuerdo con la técnica propuesta por Zucconi *et al.*, (1981).

REACTIVOS:

- Etanol 50%.

PROCEDIMIENTO:

Se humedece el material hasta alcanzar el 60% de humedad y se deja equilibrar en reposo durante 30 minutos. Se añaden 13,5 ml de agua desionizada por gramo de muestra seca para diluir este extracto hasta el 10% y se filtra con membrana celulósica de 0,45 µm de diámetro de poro.

En placas Petri de 10 cm de diámetro, cubiertas con papel de filtro, se ponen ocho semillas de *Lepidium Sativum* y se añade 1 ml del extracto acuoso, se realizan diez duplicados. Las semillas se incuban a 27°C durante 48 horas en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añade 1 ml de una mezcla de etanol y agua 1:1 (v:v), para detener el crecimiento de las plantas. Se cuenta el número de semillas germinadas y la longitud de las raíces por placa.

Los resultados se expresan como índice de germinación, el cual se obtiene al multiplicar el porcentaje de germinación (%G) y el porcentaje de crecimiento de las raíces (%L) respecto al control y dividir por cien.

$$\%IG = \%G \times \%L / 100$$

2.1.19. MINERALIZACIÓN DE LA MUESTRA.

Digestión nítrico-perclórica de las muestras según el método recomendado por Abrisqueta y Romero (1969).

REACTIVOS:

- Ácido nítrico concentrado ($d = 1,33 \text{ g/cm}^3$).
- Ácido perclórico 60%.
- Ácido clorhídrico 0,5 M.

PROCEDIMIENTO:

En un tubo de digestión con enrase hasta 50 ml se pesan aproximadamente 0,25 g de muestra con una precisión de 0,0001 g. Se añaden 3 ml de mezcla nítrico-perclórica (2:1) y se deja macerar durante tres o cuatro horas. Se calienta a 150°C durante una hora y a 210°C durante dos horas en bloque digestor. Las paredes y fondo se lavan con ácido clorhídrico 0,5 M hasta llevar el volumen a 25 ml y a continuación se filtra con papel lavado a los ácidos.

2.1.20. SODIO, POTASIO, CALCIO, MAGNESIO, HIERRO, MANGANESO, COBRE, CINC, PLOMO, CADMIO, CROMO Y NIQUEL.

Sodio y potasio se determinan mediante emisión atómica, en diluciones adecuadas del extracto de mineralización. Se añade LaCl_3 (0,1% La) como supresor de ionización. El resto de los elementos se obtienen por espectrofotometría de absorción atómica, en diluciones adecuadas del extracto

de mineralización de las muestras. Calcio y magnesio se miden en presencia de cloruro de lantano (0,1% La), para evitar la interferencia de los fosfatos. En el caso del cromo se utiliza NH_4Cl al 2% como modificador de matriz.

2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN PILAS DE COMPOSTAJE

Las concentraciones de CO_2 , CH_4 y N_2O se miden mediante un sistema de cámara cerrada situado en la cima de las pilas (Sommer *et al.*, 2004) donde los gases generados se acumulan durante un periodo de 30 minutos. Las muestras de gases se toman semanalmente durante la fase bio-oxidativa y quincenalmente durante la etapa de maduración.

Las cámaras de aluminio (volumen: $0,010 \text{ m}^3$, área: $0,038 \text{ m}^2$) se distribuyen en cinco puntos distintos sobre la superficie de la pila y se introducen 5 cm hacia el interior de la misma para evitar el escape de los gases acumulados (figura V.3). La colocación inicial de las cámaras (tiempo 0) se realiza con una diferencia de un minuto entre ellas, de forma que entre la primera cámara y la última hayan transcurrido cinco minutos.



Figura V.3 Colocación y distribución de las cámaras cerradas sobre la superficie de las pilas de compostaje.

La toma de muestra se realiza en el espacio de cabeza (figura V.4). A tiempo 0, 15 y 30 minutos, se extrae una muestra de gas (8 ml) mediante una

jeringuilla desechable y se almacena en un tubo a vacío de 5 ml (vacutainer®) para su posterior análisis por cromatografía de gases.



Figura V.4 Toma de muestra. Se muestran los tubos (vacutainer®) donde se almacenan las muestras de gas.

El cromatógrafo de gases utilizado es un equipo Varian CP 4.900, con columna PoraPlot Q (10 m de longitud, 0,15 mm de diámetro interno) y detector de conductividad térmica (TCD). Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de la columna de 50°C, temperatura del detector de 100°C, gas portador He a una presión de 25 Psi. El flujo de gases se calcula mediante el ajuste de los datos experimentales a un polinomio de segundo grado (concentración de gas vs tiempo) (Hao *et al.*, 2001) y se expresa en gramos de C ó N por unidad de superficie (m²) y por tiempo (día).

2.3. ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN SUELO

La medida de la cantidad de carbono mineralizado en suelos enmendados se realiza mediante análisis del C-CO₂ desprendido de los suelos enmendados durante experiencias de incubación. Los ensayos constaron de las siguientes etapas:

2.3.1. PRE-ACONDICIONAMIENTO DEL SUELO

Incubación previa del suelo durante un periodo de siete días, a 25°C y 40% de su capacidad de retención hídrica, con la finalidad de reactivar la flora microbiana del suelo seco y estabilizarla antes de proceder con la incubación.

Se realiza en un recipiente hermético que contiene un pequeño vial con agua desionizada, para minimizar las pérdidas de humedad del suelo, y otro vial con disolución de NaOH 0,1 M para capturar el CO₂ generado (figura V.6). Durante este periodo es necesario airear de forma periódica el recipiente para asegurar las condiciones aeróbicas en su interior.



Figura V.6 Pre-acondicionamiento de los suelos antes de su uso en las experiencias de incubación.

2.3.2. INCUBACIÓN DE LOS SUELOS ENMENDADOS

Las enmiendas orgánicas utilizadas en estas experiencias son las correspondientes a los cinco puntos críticos (I, T₁, T₂, F y M) representativos del proceso de compostaje de cada una de las mezclas TS, DTS, THU y TOS, preparadas el 1º año experimental (Apartado V.1).

Las enmiendas se añaden al suelo pre-acondicionado en una proporción del 2%, equivalente a 48 t ha⁻¹ (0,5 g de enmienda orgánica en 25 g de suelo, en peso seco). Los suelos enmendados, junto a un suelo control sin enmendar, se incuban a 25°C durante dos meses en frascos de vidrio (frascos ISO) de 100 ml de capacidad, tal y como se muestra en la figura V.7.



Figura V.7 Incubación de los suelos enmendados y control.

2.3.3. ANÁLISIS DE LOS GASES

La medida del CO₂ desprendido de los suelos durante las incubaciones se realiza mediante un sistema semiautomático de toma de muestra y análisis en continuo diseñado para la medida de CO₂ de forma regular a un máximo de 16 muestras (Mondini *et al.*, 2010). El sistema opera como un sistema de “cámara abierta” en el que los recipientes de cristal que contienen las muestras son aireados continuamente con un flujo de aire constante (0,13 ml/s) para garantizar las condiciones aeróbicas del suelo. A intervalos de tiempo regulares, un único recipiente se transforma en un sistema de “cámara cerrada” durante 15 minutos mediante un sistema de dos válvulas “Microelectric Multiposition Valve Actuators” de Valco Instruments Co. Inc., modelo SC16MWE.

Durante el tiempo en el que el recipiente se mantiene como sistema cerrado, el aire de su interior se recircula con un flujo constante de 0,13 ml/s por medio de una bomba peristáltica. Esto permite la homogenización de los gases formados que se acumulan durante ese tiempo. La concentración de CO₂ en el interior de la cámara cerrada se mide automáticamente al comienzo y al final del periodo mediante un cromatógrafo de gases Varian, CP 4.900.

La velocidad de emisión de CO₂ para cada una de las muestras se calcula por diferencia entre la concentración final e inicial de CO₂ en el intervalo de tiempo de trabajo, y se expresa en µg de C-CO₂ por gramo de suelo y por hora. Una vez finalizados los 15 minutos de medida, el sistema automático de válvulas selecciona la siguiente muestra que se transforma entonces en un sistema cerrado en el que se realizan nuevas medidas de CO₂ como en el caso descrito. El equipo realiza una medida de cada una de las 16 muestras cada 240 minutos (16 x 15 minutos), que es el tiempo necesario para completar un ciclo de medidas. La figura V.8 esquematiza el funcionamiento del sistema en su conjunto.

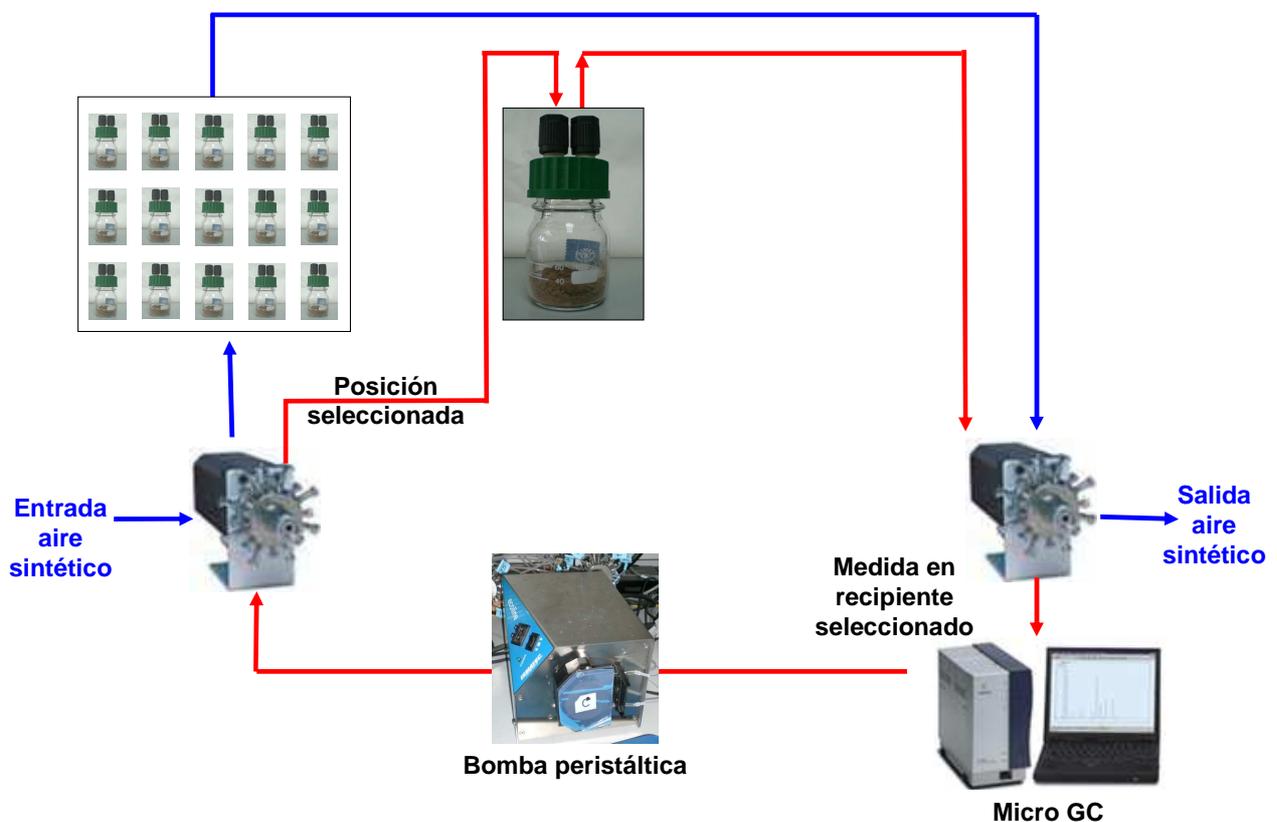


Figura V.8 Descripción del sistema de toma de muestra y análisis.

La emisión de CO₂ se mide de forma regular durante los dos meses de incubación. La medida se realiza de forma continua durante los primeros cuatro o cinco días de incubación. Durante las tres semanas siguientes se realizan periodos de medida continua de 48 horas aproximadamente, dos veces por semana, y durante el segundo mes de incubación se mide de forma continua

durante periodos de 24 – 48 horas una vez por semana. En total se obtienen una media de 100 determinaciones de la emisión de CO₂ para cada una de las muestras durante los dos meses de incubación.

2.3.4. ESTUDIO CINÉTICO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos relativos a las cantidades acumuladas del CO₂ desprendido durante el periodo de incubación (expresado en porcentaje de C-CO₂ mineralizado respecto al carbono añadido con la enmienda) se ajustaron a dos ecuaciones cinéticas por el método de mínimos-cuadrados no lineal mediante el programa informático SigmaPlot para Windows, versión 10.0. Las ecuaciones cinéticas usadas fueron las siguientes:

Modelo de primer orden: $C_m = C_0 (1 - \exp(-kt))$

Modelo de primer orden combinado: $C_m = C_R (1 - \exp(-k_R t)) + C_S (1 - \exp(-k_S t))$

En estas ecuaciones C_m representa el porcentaje de carbono mineralizado a tiempo t (días), C_0 es el porcentaje de carbono potencialmente mineralizable y k es la constante de velocidad (días⁻¹). C_R y C_S son los porcentajes de carbono mineralizable de las etapas rápidas y lenta, respectivamente, y k_R y k_S las constantes de velocidad de dichas etapas en el modelo combinado.

La validez del ajuste a los modelos cinéticos se realizó por comparación de la suma de los cuadrados de los residuales (SCR) y evaluando el valor de la F . En los casos en los que la SCR fuese menor en el modelo de primer orden, se aceptaría el ajuste del primer modelo. Por el contrario, en los casos en que la SCR del modelo de primer orden fuese mayor, la selección del mejor ajuste se realiza mediante el test de la F para el incremento de SCR (Motulsky, 2004). En este test, se tienen en cuenta la SCR y los grados de libertad (GL) de cada uno de los ajustes, que vienen determinados por la diferencia entre el número de medidas realizadas y el número de parámetros usados en el ajuste (dos en el caso del modelo de primer orden y cuatro en el modelo combinado). La ecuación que se aplicó para calcular la F , es la siguiente:

$$F = \frac{(SCR_1 - SCR_2) / SCR_2}{(GL_1 - GL_2) / GL_2}$$

donde, SCR_1 y SCR_2 son la suma de los cuadrados de los residuales del modelo de primer orden y el modelo combinado, respectivamente, y GL_1 y GL_2 son los grados de libertad de dichos modelos. A partir del valor de F , y teniendo en cuenta los GL de los modelos, se calcula el nivel de probabilidad P de que la disminución de la SCR del modelo combinado frente al sencillo haya sido causada por azar (hipótesis nula). Si $P < 0,05$, la disminución de la SCR del modelo combinado es significativa, frente al modelo sencillo, y por tanto el modelo combinado es el que genera un mejor ajuste.

El nivel de significación de los parámetros cinéticos se realizó mediante la prueba T de Student comparando por parejas los parámetros obtenidos para cada pila a los distintos grados de madurez (I , T_1 , T_2 , F , M). La ecuación utilizada en esta prueba, es la siguiente:

$$T = \frac{C_1^2 - C_2^2}{\sqrt{\frac{s_1^2 - s_2^2}{n}}}$$

donde, C_1 y C_2 , son las estimaciones de los parámetros cinéticos comparados; s_1 y s_2 , sus respectivas desviaciones estándar; y n , el total de datos usados para el ajuste a las ecuaciones cinéticas.

Al tratarse de comparaciones múltiples y para evitar falsos positivos, se utilizó el ajuste de Bonferroni para ajustar el nivel de significación en relación al número de comparaciones realizadas simultáneamente. En el caso de cinco parámetros, el número de combinaciones posibles sería 10 (obtenido mediante la ecuación $k(k-1)/2$, donde k es el número de parámetros). El nivel de

significación corregido se calcula dividiendo el nivel de probabilidad deseado (en nuestro caso $P < 0,05$) por el número de combinaciones posibles.

2.4. ENSAYOS DE HUMIFICACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN SUELO

El estudio de los procesos de humificación de la materia orgánica en suelos enmendados consta de las siguientes etapas:

2.4.1. PRE-ACONDICIONAMIENTO DEL SUELO

Incubación previa del suelo durante un periodo de siete días, a 25°C y 40% de su capacidad de retención hídrica, del modo descrito en el Apartado 2.3.1.

2.4.2. INCUBACIÓN DE LOS SUELOS ENMENDADOS

Las enmiendas orgánicas utilizadas en esta experiencia son las correspondientes a tres de los cinco puntos críticos (I, T₂ y M) representativos del proceso de compostaje de las mezclas TS, THU y TOS, preparadas el 1º año experimental (Apartado V.1).

Se pesan 180 g (peso seco) de suelo pre-acondicionado y se adiciona la enmienda orgánica en una proporción del 2%, equivalente a 48 t ha⁻¹. Se preparan tres réplicas con cada enmienda. El suelo enmendado, junto a un suelo control sin enmendar (también por triplicado), se incuba a 25°C durante cinco meses (150 días) en recipientes herméticos de plástico de 800 ml de capacidad conteniendo un vial de 10 ml con agua desionizada para minimizar las pérdidas de humedad del suelo.

Se toman 60 g de muestra (peso seco) de cada recipiente transcurridos 90 días de incubación y al final de la misma (150 días). Se secan al aire y se conservan en bolsas de cierre hermético para la posterior extracción de las sustancias húmicas.

2.4.3. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS (SH)

En la Parte Experimental de esta memoria (Apartado III.2.4, figura 1), se muestra un esquema del procedimiento de trabajo, basado en la extracción secuencial de las SH y en su fraccionamiento mediante la variación del pH y el uso de una resina de Polivinilpirrolidona (PVP).

PROCEDIMIENTO:

Se pesan 45 g de muestra de suelo seco y se realiza una extracción (1:10 p/v) con NaOH 0,5 M durante una hora en atmósfera de nitrógeno. El extracto se centrifuga durante 15 minutos a 4.000 rpm y se filtra a vacío con filtros de celulosa de 0,4 μm . En este extracto se encuentran los ácidos húmicos (AH) y fúlvicos (AF) no enlazados a la fracción mineral del suelo (fracción de SH “libres”). Se conservan, a parte, 60 ml de este extracto para la posterior separación de las fracciones húmica y no húmica (Apartado 2.4.4) y la determinación del C_{OT} de cada una de ellas (Apartado 2.4.5).

A continuación, se realiza una segunda extracción (1:10 p/v) con una disolución de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 M y NaOH 0,1 M sobre el residuo sólido de la primera extracción. Se mantiene en agitación durante una hora en atmósfera de nitrógeno. El extracto se centrifuga durante 15 minutos a 4.000 rpm y se filtra a vacío con filtros de celulosa de 0,4 μm . En este segundo extracto se encuentran los AH y AF químicamente enlazados a la fracción mineral del suelo (fracción de SH “enlazadas”). Se conservan, a parte, 60 ml de este extracto para la posterior separación de las fracciones húmica y no húmica (Apartado 2.4.4) y la determinación del C_{OT} de cada una de ellas (Apartado 2.4.5).

Los AH se precipitan a $\text{pH} \leq 2$ en cada uno de los extractos mediante adición de H_2SO_4 concentrado. Se deja en reposo a 4°C durante 24 horas para conseguir una completa precipitación de los AH. Estos se separan del

sobrenadante (AF) por centrifugación a 4.000 rpm durante 20 minutos y posterior decantación. Los AH se redisuelven en NaOH 0,5 M y se tratan con Amberlita IR-H⁺ hasta alcanzar pH neutro. Después se liofilizan para su posterior caracterización (Apartado 2.4.6).

Los AF de cada extracto se fraccionan a su vez para separar la MO no humificada (NH) de los verdaderos AF. Se realiza mediante cromatografía de adsorción (extracción en fase sólida, SPE) sobre PVP (Leita y De Nobili, 1991) (Apartado 2.4.4). Una vez obtenidos los AF, se tratan con Amberlita IR-H⁺ hasta alcanzar pH neutro antes de su liofilización.

2.4.4. SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES HÚMICA Y NO HÚMICA. FRACCIONAMIENTO DE LOS AF.

Como se indica en el Apartado 2.4.3, se han conservado, a parte, 60 ml de cada uno de los extractos para proceder a la separación de las fracciones húmica y no húmica de cada uno de ellos, mediante SPE con PVP empaquetada en columna (De Nobili, 1991).

REACTIVOS:

- H₂SO₄, 0,1 N
- NaOH, 0,5 N
- Polivinilpirrolidona
- Lana de vidrio
- Papel de filtro
- Jeringas de 10 ml

PROCEDIMIENTO:

Acondicionamiento de la resina de PVP:

Se realiza un primer lavado de la resina con agua desionizada seguido de dos lavados con H₂SO₄, 0,1 N. Se enjuaga de nuevo con agua desionizada y se lava a continuación con NaOH, 0,5 N. Se enjuaga con agua y se realizan

dos últimos lavados con H_2SO_4 , 0,1 N. La resina queda así acondicionada en su forma $-\text{H}^+$.

Preparación de la columna:

La jeringa utilizada como columna es de 10 ml. Se coloca un trozo de papel de filtro del diámetro de la jeringa y un poco de lana de vidrio en su interior y posteriormente se rellena con la resina entre 6-8 ml.

Separación de las fracciones:

Se toma una alícuota de 25 ml de cada extracto y se separan los AH por precipitación a pH 1,5 mediante adición de H_2SO_4 concentrado. El extracto se centrifuga durante 15 minutos a 4.000 rpm y se filtra a vacío con filtros de celulosa de 0,4 μm .

La fracción de AF en disolución se pasa por la columna de PVP previamente acondicionada en forma $-\text{H}^+$. En la resina quedan retenidos los AF debido a sus características fenólicas mientras que la componente no humificada (NH) atraviesa la columna. La resina de PVP forma puentes de hidrógeno principalmente con grupos fenólicos, hidroxilo y carboxilo (figura V.10).

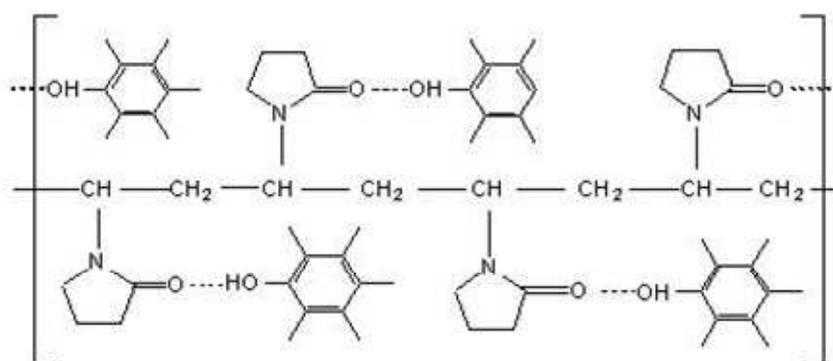


Figura V.10 Estructura de la resina de PVP. Interacción mediante enlace por puente de hidrógeno con grupos fenólicos.

Se hace pasar por la columna la disolución de H_2SO_4 , 0,1 N y el eluyente (componente NH) se recoge en un matraz de 50 ml, etiquetado como fracción A, y se enrasa con la disolución de H_2SO_4 0,1 N.

A continuación, se eluyen los AF retenidos en la resina haciendo pasar la disolución de NaOH 0,5 N por la columna. Esta fracción se recoge en un matraz de 25 ml etiquetado como fracción B. Antes del enrase con NaOH 0,5 N, los AH previamente separados se redisuelven, con unas gotas de esta disolución y se adicionan al mismo matraz (fracción B) formando así la fracción húmica (AH + AF).

2.4.5. C_{OT} DE LAS FRACCIONES HÚMICA Y NO-HÚMICA

El C_{OT} de las fracciones NH (fracción A) y húmica (fracción B), obtenidas de acuerdo con el Apartado II.4.4, se determina mediante el método de oxidación húmeda con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Walkley y Black, 1934) modificado.

2.4.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS (AH)

4.6.1. ANÁLISIS ELEMENTAL

La composición elemental (C, H, y N) de los AH liofilizados (Apartado 2.4.3) se determina por duplicado en un analizador elemental (Apartado 2.1.5). El contenido en oxígeno se calcula por diferencia y, por tanto, puede contener trazas de azufre y/o fósforo.

4.6.2. ANÁLISIS TÉRMICO

Los análisis termogravimétricos de los AH liofilizados (Apartado 2.4.3) se realizan en un equipo SDT-2960 simultáneo DSC-TGA, de TA Instruments. Las condiciones experimentales para la obtención de los termogramas fueron: atmósfera estática de aire, temperatura de equilibrio de 30°C seguido de calentamiento desde 30 hasta 105°C a una velocidad lineal de 5°C min^{-1} para calcular la humedad de los ácidos húmicos. Pasados 10 minutos se eleva la

temperatura desde 105 hasta 680°C (5°C min⁻¹). El contenido de cenizas de los ácidos húmicos se calcula a partir del residuo inorgánico restante. Las principales pérdidas de peso tienen lugar en los rangos de temperatura 110-350°C (W₁) y 350-550°C (W₂). Con la información generada en los termogramas se determina el índice de labilidad térmica de los AH (R₁):

$$R_1 = W_2/W_1$$

4.6.3. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL (HPLC-SEC)

REACTIVOS:

- Tris-hidroximetilaminometano (Tris), 0,75 mM, pH 7,3.
- Ácido fosfórico
- KCl, 0,1 M
- NaOH, 0,1 N

PROCEDIMIENTO:

La distribución de pesos moleculares de los AH se obtiene mediante cromatografía de exclusión (HPLC-SEC) sobre una columna Biorad BioSil 250 calibrada con fracciones de sustancias húmicas de baja polidispersión y disoluciones estándar de sulfonato de poliestireno con los siguientes pesos moleculares: 77, 17, 8, 6,8 y 5 kDa. El eluyente utilizado es la disolución de Tris ajustada a pH 7,3 con ácido fosfórico.

Las muestras liofilizadas de AH (Apartado 2.4.3) se disuelven en la mínima cantidad de NaOH 0,1 N y se diluyen con Tris 0,75 mM hasta una concentración de 0,1 mg/ml. Se ajusta de nuevo el valor de pH a 7,3.

El detector UV-Vis se ajusta a una longitud de onda de 320 nm en el caso de los AH libres y a 400 nm en el caso de los AH enlazados a la fracción mineral del suelo (Apartado 2.4.3).

4.6.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).

Los espectros de infrarrojo se realizan en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 16F PC FT-IR sobre pastillas de KBr. Las pastillas se obtienen al mezclar 1 mg de muestra de AH liofilizado con 300 mg de KBr para espectroscopía, previamente seco.

4.6.5. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C DE SÓLIDOS (CPMAS-TOSS RMN- ^{13}C).

Los experimentos en estado sólido de CPMAS-TOSS utilizan la técnica de la polarización cruzada y rotación en el ángulo mágico (Cross Polarization-Magic Angle Spinning: CPMAS) y eliminan las bandas de rotación del espectro (Total Suppression of Side-bands: TOSS) que a veces pueden complicar su análisis.

Los espectros se registraron con un espectrómetro Varian 300 MHz operando a una frecuencia de resonancia para el ^{13}C de 75,42 MHz. Los experimentos de CPMAS se llevaron a cabo con una anchura espectral de 50 kHz, 90° de pulso de 6,7 ms, tiempo de contacto de 1,5 ms, velocidad de rotación de 4 kHz, retraso de pulso de 4 s y tiempo de adquisición de 35 ms. Los espectros se obtuvieron tras la adquisición de 20.000 scans y se dividieron en 6 regiones correspondientes a los siguientes intervalos de desplazamiento químico (ppm): 0-45 (alquilo); 45-65 (N-alquilo y metoxilo); 65-95 (O-alquilo); 95-108 (acetal); 108-160 (fenilo); 160-210 (carboxilo, amida, éster y carbonilo). Las áreas se estimaron mediante el software del equipo Brüker Topspin 20. Para estimar el área en la región del C-carboxílico y evitar la interferencia de la medida del carbono debido a carbonatos se realizó la deconvolución de los espectros para aislar las señales y medir cada una de forma independiente.

2.5. SUELOS

2.5.1. HUMEDAD (H)

Siguiendo el mismo procedimiento descrito para los residuos orgánicos y muestras de compost (Apartado 2.1.1).

2.5.2. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (C_{OT}), NITRÓGENO TOTAL (N_T)

Se realiza quemando la muestra a 1.020°C en un analizador elemental NA 1500. Siguiendo el mismo procedimiento descrito para los residuos orgánicos y muestras de compost (Apartado 2.1.5).

2.5.3. MATERIA ORGÁNICA (MO)

Se obtiene multiplicando el valor de C_{OT} obtenido en el Apartado 2.5.2 por el factor 1,72 (Navarro *et al.*, 1991).

2.5.4. MEDIDA DEL pH Y LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (CE)

Los valores de pH en agua se midieron sobre pasta saturada, utilizando pH-metro con electrodo de vidrio CRISON modelo 2001.

Para la medida de la CE se obtiene un extracto salino 1:5 (p:v) previa agitación mecánica durante una hora. Se utiliza un conductímetro CRISON modelo GLP 31.

2.5.5. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

Separación de las fracciones gruesas por tamizado y de las finas por sedimentación, utilizando un dispersante apropiado y después de eliminar los carbonatos (Guitian y Carballas, 1976).

REACTIVOS:

- Peróxido de hidrógeno de 110 volúmenes
- Acido acético

-Disolución dispersante: Hexametáfosfato sódico al 5%

PROCEDIMIENTO:

Según su contenido en materia orgánica y sales solubles, se pesa con precisión de 0,01 g una cantidad tal de suelo fino y seco al aire que, una vez eliminada la materia orgánica con peróxido de hidrógeno y las sales solubles, queden aproximadamente 10 g.

Se destruyen los carbonatos para obtener mejor dispersión, añadiendo 300 ml de agua y 9 ml de ácido acético a cada muestra. Se agita suavemente hasta que la reacción sea completa (que se aprecia por la desaparición del burbujeo). Se centrifuga y se decanta el líquido sobrenadante. Para eliminar la materia orgánica, se añaden 200 ml de agua desionizada y 30 ml de peróxido de hidrógeno de 110 volúmenes. Se agita y se calienta para facilitar su destrucción. Se evapora el exceso de agua, se seca y se pesa. A continuación se añaden 60 ml de disolución dispersante y agua hasta un volumen de 200 ml. Se agita en una botella de un litro durante ocho horas.

Se coloca, sobre una probeta de un litro, un embudo de boca ancha y sobre él un tamiz de 50 μm de luz. Se pasa la muestra por el tamiz lavando con agua varias veces. En el tamiz queda retenida la arena gruesa y fina, que se pasa a una cápsula tarada, la cual se seca y pesa. La diferencia entre la primera determinación (arena gruesa + arena fina) y la segunda (arena gruesa) da el valor de la arena fina.

Se añade agua destilada a la probeta hasta completar 1 L y se agita. Tras haber tomado la temperatura, se saca la varilla del agitador lentamente y se toma nota del tiempo. Se determina el tiempo necesario para la sedimentación según la ecuación de Stokes (Black, 1965). Transcurrido este tiempo, ocho horas aproximadamente dependiendo de la temperatura, se introduce la pipeta de Robinson 10 cm en la probeta y se toman 20 ml que se pasan a una cápsula tarada. A continuación, la cápsula se seca y se pesa. El valor así obtenido corresponde a la fracción menor de 20 μm que es una mezcla de limo y arcilla.

La suspensión restante se agita nuevamente y se deja reposar ocho horas si la temperatura es de 20°C según la ley de Stokes. Transcurrido este tiempo, se toman 20 ml con la pipeta Robinson, introduciéndose 10 cm en la probeta, y se pasan a una cápsula tarada. A continuación, la cápsula se seca y se pesa. Ésta fracción representa la arcilla, fracción menor de 2 μm .

En estos pesos obtenidos para limo + arcilla y para arcilla hay que tener presente el peso del dispersante añadido. Para ello se toman 10 ml de dispersante, se seca y se pesa. Con este valor se corrigen los valores antes obtenidos. La diferencia entre la primera determinación (limo + arcilla) y la segunda (arcilla) da el valor del limo.

2.5.6. TEXTURA

A partir de los porcentajes calculados en el análisis granulométrico, para arenas, limos, y arcillas, y mediante el diagrama de texturas propuesto por el United States Salinity Laboratory Staff (USDA, 1999) se clasifica el suelo en el tipo textural correspondiente.

2.5.7. CARBONATOS TOTALES

Medida del volumen de anhídrido carbónico por acción del ácido clorhídrico sobre los carbonatos de la muestra (U.S. Salinity Laboratory Staff, 1954).

REACTIVOS:

- Acido clorhídrico 1:1
- Carbonato cálcico

PROCEDIMIENTO:

Calibración del calcímetro Bernard con carbonato cálcico puro, y deducción, de este ensayo, del peso de muestra a tomar para que las lecturas obtenidas representen directamente porcentajes de carbonato cálcico. Se calibra con 0,3 g de CaCO_3 seco.

2.5.8. FÓSFORO ASIMILABLE

Extracción del fósforo que se encuentra en el suelo en forma asimilable para las plantas (Watanabe y Olsen, 1965). Determinación colorimétrica mediante la reducción del complejo molibdofosfato amónico con ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962).

REACTIVOS:

-Bicarbonato sódico 0,5 M (pH 8,5)

-Carbón activo

-Acido sulfúrico 2,5 M

-Fosfato monopotásico

-Reactivo A:

Se disuelven 12 g de molibdato amónico en 250 ml de agua. Se disuelven 0,2908 g de tartrato de amonio y potasio en 100 ml de agua. Llevar a 2 L con ácido sulfúrico 2,5 M.

-Reactivo B (Preparar diariamente):

Se disuelven 1,056 g de ácido ascórbico en 200 ml de reactivo A.

PROCEDIMIENTO:

Se pesan 10 g de muestra, se añade 1 g de carbón activo y 100 ml de NaHCO_3 . Se agita mecánicamente durante 30 minutos y se filtra con papel lavado a los ácidos.

A partir de una disolución de fosfato monopotásico de 5 mg/L de P se prepara una recta patrón entre 0,5 y 4 ppm de P. Se toman 2 ml de muestra o de patrón y se añaden 4 ml de agua, 2 ml de H_2SO_4 2,5 M y 2 ml de reactivo B

recientemente preparado. Se agita y se deja en reposo durante 30 minutos. Se mide la absorbancia a 696 nm.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

Abrisqueta, C. y Romero, M. 1969. Digestión húmeda rápida de suelos y materiales orgánicos. *Anales de Edafología y Biología* 27, 855-867.

ANSI/ASTM. 1977a. Standard test methods for lignin wood. D1103. American National Standard.

ANSI/ASTM. 1977b. Standard test methods for lignin wood. D1106. American National Standard.

Black, C.A. 1965. *Methods of Soils Analysis*, (Eds.) American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, E.E.U.U.

Brink, R.H. Jr., Dubach, P., Lynch, D.L. 1959. Measurement of carbohydrates in soil hydrolyzates with anthrone. *Soil Science* 89, 157-166.

Browning, B.L. 1967. *Methods of Wood Chemistry*, Interscience Publishers, New York, USA, pp. 343-360.

Gutián,F. y Carballas,T. 1976. *Técnicas de análisis de suelos*. (Eds.) Pico Sacro. Santiago de Compostela. España.

Hao, X., Chang, C., Larney, F.J., Travis, G.R. 2001. Greenhouse gas emissions during cattle feedlot manure composting. *Journal of Environmental Quality* 30, 376-386.

Kempers, A.J. y Zweers, A. 1986. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Communications in Soil and Plant Analysis* 17, 715-723.

- Lax, A., Roig, A., Costa, F. 1986. A method for determining the cation exchange capacity of organic materials. *Plant and Soil* 94, 349-355.
- Leita, L. y De Nobili, M. 1991. Water-soluble fractions of heavy metals during composting of municipal solid waste. *Journal of Environmental Quality* 20 (1), 73-78.
- Maestro-Durán, R., Borja-Padilla, R., Martín-Martín, A., Fiestas Ros de Ursinos, J.A., Alba-Mendoza, J. 1991. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes em el alpechín. *Grasas y Aceites* 42(4), 271-276.
- Mehlich, A. 1948. Determination of cation and anion-exchange properties of soils. *Soil Science* 66, 429-445.
- Mondini, C., Cínico, T., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A. 2010. A simple automated system for measuring soil respiration by gas chromatography. *Talanta* 81, 849-855.
- Motulsky, H., Christopoulos, A., 2004. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Ed: Oxford University Press, pp 352.
- Murphy, J. y Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
- Navarro, A.F., Cegarra, J., Roig, A., Bernal, M.P. 1991. An automatic microanalysis method for the determination of organic carbon in wastes, *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 22, 2137-2144.
- Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Martínez Pardo, C., Cegarra, J., Paredes, C. 1996. A microanalysis method for determining total organic carbon in

extracts of humic substances. Relationships between total organic carbon and oxidable carbon. *Bioresource Technology* 57, 291-295.

Sommer, S.G., Kjellerup, V., Kristjansen, O. 1992. Determination of total ammonium nitrogen in pig and cattle slurry: sample preparation and analysis. *Acta Agriculturae Scandinavica*. Section B, Soil and Plant Science 42(3), 146-151.

Sommer, S.G., McGinn, S.M., Hao, X., Larney, F.J. 2004. Techniques for measuring gas emissions from a composting stockpile of cattle manure. *Atmosphere and Environment* 38, 4643-4652.

USDA, 1999. Soil Survey Staff. Soil taxonomy: A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2nd edition. Natural Resources Conservation Service. U.S. Department of Agriculture Handbook 436.

Walkley, A. y Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29-38.

Watanabe, F.S. y Olsen, S.R. 1965. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO_3 extracts from soils. *Soil Science Society of America Proc.* 29, 677-678.

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., De Bertoldi, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.

ABREVIATURAS

AF: ácidos fúlvicos.

AH: ácidos húmicos.

AN: alperujo fresco (nuevo).

AV: alperujo seco (viejo).

DTS: pila de compostaje compuesta por alperujo seco y estiércol de oveja (1:1). El acrónimo se forma de la terminología inglesa: dry two-phase olive mill waste (DT), sheep manure (S).

EC: estiércol de caballo.

EO: estiércol de oveja.

FT-IR: “Fourier Transform Infrared Spectroscopy” Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier.

GEI: gases de efecto invernadero.

HPLC: “High Performance Liquid Chromatography” Cromatografía líquida de alta resolución.

HPLC-SEC: “Size Exclusion HPLC” Cromatografía de Exclusión Molecular HPLC.

IPCC: “Intergovernmental Panel on Climate Change” Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático.

MO: material orgánica.

P: restos de poda de olivo.

PVP: polivinilpirrolidona.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RothC: Rothamsted carbon model.

RSU: residuos sólidos urbanos.

SH: sustancias húmicas.

SPE: "Solid Phase Extraction" Cromatografía de filtración en gel (extracción en fase sólida).

THU: pila de compostaje compuesta por alperujo fresco, estiércol de caballo (1:2) y urea. El acrónimo se forma de la terminología inglesa: two-phase olive mill waste (T), horse manure (H), urea (U).

TOS: pila de compostaje compuesta por alperujo fresco, restos de poda de olivo y estiércol de oveja (1:1:3). El acrónimo se forma de la terminología inglesa: two-phase olive mill waste (T), olive tree prunings (O), sheep manure (S).

TOU: pila de compostaje compuesta por alperujo fresco, restos de poda de olivo (1:2) y urea. El acrónimo se forma de la terminología inglesa: two-phase olive mill waste (T), olive tree prunings (O), urea (U).

TS: pila de compostaje compuesta por alperujo fresco y estiércol de oveja (1:2). El acrónimo se forma de la terminología inglesa: two-phase olive mill waste (T), sheep manure (S).

U: urea.