



Facultad de Química.
Universidad de Murcia.



Centro de Edafología y Biología
Aplicada del Segura.
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas.

EXTRACCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA SOLUBLE DE UN COMPOST DE ORUJO DE OLIVA DE DOS FASES

Memoria de la Tesis de Licenciatura que presenta

Germán Tortosa Muñoz

Murcia, Septiembre de 2007

RESUMEN

La aplicación al suelo de la materia orgánica de los residuos, estabilizada e higienizada mediante compostaje, es el uso más adecuado para éstos ya que confiere al mismo una mejora en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, enriqueciéndolo en compuestos similares a las sustancias húmicas y aumentando la disponibilidad de nutrientes. Según las características del compost, puede emplearse como enmendante orgánico, que actuaría principalmente sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, o como abono, mejorando además la nutrición mineral de las plantas lo que permite reducir el uso de fertilizantes minerales. Su uso puede ser mediante forma sólida o líquida, siendo esta última de alto interés económico como demuestran los cada vez más numerosos preparados líquidos extraídos de composts y estiércoles que se encuentran en el amplio mercado de los agroquímicos comerciales. El orujo de oliva de dos fases o alperujo (AL), principal subproducto de la industria extractiva del aceite de oliva en España, permite elaborar composts muy ricos en materia orgánica que puede ser utilizados para la obtención de extractos organo-minerales líquidos potencialmente útiles en fertirrigación. En este trabajo, se estudia la materia orgánica soluble (MOS) obtenida a partir de un compost de AL bajo tres condiciones de extracción distintas, caracterizándola mediante la cuantificación del carbono orgánico solubilizado, el contenido en fenoles y en carbohidratos sencillos y evaluando el rendimiento obtenido en cada uno de los procesos extractivos.

Este trabajo de investigación se ha realizando dentro del proyecto de investigación:
"RECICLADO DEL ALPERUJO Y APLICACIÓN DE SUS COMPONENTES SOLUBLES COMO ENMENDANTES DE SUELOS DEGRADADOS: EFECTOS SOBRE PLANTA Y RIZOSFERA EN ESPECIES DE INTERÉS FORRAJERO Y FORESTAL." (AGL2002-00662).

-“Yo tengo un sueño que puede traer más belleza y armonía al mundo. Si renuncio a él solo porque hay quienes no comprenden y se burlan de mí, tendría que dejar de creer en la belleza y en la importancia de perseguir los sueños hasta el final”-

Gioconda Belli

...Este *soñador* quisiera mostrar su agradecimiento a las siguientes personas que, por medio de su dirección, sabiduría, consejos, ayuda, compañerismo, alegría, complicidad, esperanza, decisión, esfuerzo, sentido común, sinceridad, experiencia, optimismo, comprensión y voluntad, han participado de forma activa a que el presente trabajo pudiera llevarse a cabo:

Al **Dr. Juan Cegarra Rosique**, le agradezco su dirección, consejos y sabiduría, que tanto me enseñan desde el primer día que lo conocí, hasta hoy día que escribo estas letras.

("Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez" Gabriel García Márquez)

Al **Dr. Manuel Rubio Torres**, la predisposición y ayuda demostrada en todo momento cuando lo he necesitado.

("Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano", Sir Isaac Newton)

Al **Dr. Jose Antonio Albuquerque** y **Mª Ángeles López Bermejo**, compañeros y amigos, los cuales su ayuda, experiencia y excelentes consejos me han sido fundamentales.

("Lo que embellece el desierto es que esconde un pozo en alguna parte", Antoine de Saint-Exupéry, de la novela "El Principito")

A mis compañeros **Lucía Carrasco** y **Carlos De la Fuente**, a los que les debo mucho más de lo que ellos se creen. Paciencia hermanos, y moriremos juntos y ancianos.

("La sabiduría suprema es tener sueños bastante grandes para no perderlos de vista mientras se persiguen", William Faulkner)

A **Jose Francisco Zaragoza** y **Jose Antonio Mira**, por haberme enseñado que el camino de la sabiduría no sigue un camino prefijado.

("Para llegar a ser sabio, es preciso querer experimentar ciertas vivencias, es decir, meterse en sus fauces. Eso es, ciertamente, muy peligroso; más de un sabio ha sido devorado al hacerlo", Friedrich Nietzsche)

A toda mi **familia**, los que se fueron, los que están y los que vienen de camino, ya que ellos son el pilar fundamental de mi existencia.

("Que empiece a soñar otro poco y a imaginarme tus besos, eres en la noche el sueño y en el día mi hechizo...", Diana Navarro)

Y al resto de **amigos** y **compañeros** que por falta de espacio no he podido mencionar.

("La amistad es el amor, pero sin sus alas", Lord George Gordon Noel Byron)

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes históricos y origen de las sustancias húmicas	2
1.2. Estructura de las sustancias húmicas: problemática de elucidación de modelos	5
1.3. Aislamiento de las sustancias húmicas	7
1.3.1. Extracción	8
1.3.1.1. Factores que influyen en la extracción	8
1.3.2. Fraccionamiento.....	10
1.3.3. Purificación	12
1.4. Caracterización de las sustancias húmicas	14
1.5. Materiales utilizables como fuente de sustancias húmicas	15
1.5.1. Carbones.....	15
1.5.2. Turbas.....	16
1.5.3. Estiércoles y composts	17
1.6. Compostaje de residuos orgánicos.....	19
1.7. Utilización de residuos orgánicos en agricultura	21
1.8. El caso particular de la industria extractiva del aceite de oliva en España	23
1.8.1. Evolución tecnológica del proceso extractivo y.. generación de residuos y subproductos	23
1.8.2. Gestión y aprovechamiento del <i>alperujo</i>	25
2. Objetivo y plan de trabajo	29
3. Parte experimental	32
3.1. Obtención del compost de <i>alperujo</i> y características del mismo	33
3.2. Extracción, fraccionamiento y análisis de la MOS	35
4. Resultados experimentales y discusión	39
4.1. Influencia de la relación de extracción P/V sobre la solubilidad de la materia orgánica del compost a tiempo y temperatura constantes	40
4.1.1. Efecto sobre el rendimiento de MOS	40
4.1.2. Efecto sobre el contenido de polifenoles	44
4.1.3. Efecto sobre el contenido de carbohidratos	46

4.2. Influencia del tiempo de extracción a P/V y temperatura constantes sobre la solubilidad de la materia orgánica del compost	50
4.2.1. Efecto sobre el rendimiento de MOS	50
4.2.2. Efecto sobre el contenido de polifenoles	54
4.2.3. Efecto sobre el contenido de carbohidratos	57
4.3. Influencia sobre la solubilidad de la materia orgánica del compost de la aplicación de calor durante periodos crecientes de tiempo, extrayendo durante 24 horas a P/V constante.....	61
4.3.1. Efecto sobre el rendimiento de MOS	61
4.3.2. Efecto sobre el contenido de polifenoles	65
4.3.3. Efecto sobre el contenido de carbohidratos	68
5. Conclusiones	73
6. Métodos y técnicas experimentales	74
6.1. Caracterización del compost de <i>alperujo</i>	75
6.1.1. Preparación de la muestra	75
6.1.2. Humedad	75
6.1.3. Determinación del pH y de la conductividad eléctrica (CE)	75
6.1.4. Residuo a calcinación (cenizas).....	76
6.1.5. Materia orgánica (MO).....	76
6.1.6. Lignina klason	76
6.1.7. Holocelulosa	77
6.1.8. Celulosa	78
6.1.9. Hemicelulosa	79
6.1.10. Contenido graso	79
6.1.11. Carbono orgánico total (C _{OT}) y nitrógeno total (N _T).....	79
6.1.12. Nitrógeno en forma amónica (N-NH ₄ ⁺)	80
6.1.13. Nitrógeno en forma de nitrato (N-NO ₃ ⁻)	81
6.1.14. Carbono orgánico hidrosoluble (C _{OH})	81
6.1.15. Polifenoles hidrosolubles	82
6.1.16. Carbohidratos hidrosolubles.....	83
6.1.17. Capacidad de cambio de cationes (CCC)	83
6.1.18. Mineralización de la muestra	85
6.1.19. Fósforo total	85
6.1.20. Sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso, cinc, cromo, níquel, plomo y cadmio	86
6.1.21. Carbono extraíble (C _{EX})	86

6.1.22. Fraccionamiento de ácidos húmicos (AH) y fracción fúlvica (FF)	87
6.1.23. Índice de germinación (IG)	87
6.2. Extracción y análisis de la MOS	88
6.2.1. Extracción de MOS	88
6.2.2. Fraccionamiento de ácidos húmicos (AH) y fracción fúlvica (FF)	89
6.2.3. Fraccionamiento de ácidos fúlvicos (AF) y fracción no humificada (NH)	89
6.2.4. Carbono orgánico soluble de MOS y sus fracciones	90
6.2.5. Polifenoles solubles de MOS y sus fracciones	91
6.2.6. Carbohidratos solubles de MOS y sus fracciones	91
7. Bibliografía	92

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos y origen de las sustancias húmicas.

Las sustancias húmicas son probablemente los materiales de carácter orgánico más ampliamente distribuidos en la naturaleza, representando aproximadamente el 50 % de la materia orgánica total del suelo (Tonelli y col., 1997). Han sido objeto de estudio desde muy antiguo siendo el primer intento de aislarlas del suelo el realizado por Achard (1786), quien extrajo turba con álcali y obtuvo un precipitado oscuro y amorfo tras la acidificación. A De Saussure (1804) se le atribuye la introducción del término *humus* para describir la materia orgánica de color oscuro del suelo. Además, este investigador fue el primero en presentar la teoría de que el *humus* participa en la nutrición vegetal, que luego sería desarrollada ampliamente por Thaer (1809). El término *ácido húmico* para identificar la fracción soluble en álcali e insoluble en ácido, de la materia orgánica del suelo, tiene su origen en la época de Berzelius (1839).

A finales del siglo XIX se llegó a la conclusión que el *humus* estaba compuesto por una mezcla compleja de sustancias orgánicas, la mayoría de ellas de naturaleza coloidal con débiles propiedades ácidas, y no de compuestos químicos definidos precursores de las sustancias húmicas como trató de demostrar Mulder (1862). Shmook (1930) realizó un detallado estudio de la naturaleza y estructura de los ácidos húmicos y los consideró no como un compuesto específico sino como una mezcla de sustancias interrelacionadas con rasgos estructurales similares. Waksman (1936) recomendó la utilización del concepto *humus* para hacer referencia a la totalidad de la materia orgánica presente en el suelo. Este concepto engloba un amplio espectro de constituyentes de naturaleza orgánica que proviene de la degradación biológica y bioquímica de restos animales y vegetales, así como productos del metabolismo de los microorganismos (Schnitzer, 1978). Como resultado de esta idea, se han generado dos categorías muy generales de compuestos que componen la materia orgánica del suelo, que fueron sugeridas por Page (1930) y que siguen vigentes en la actualidad:

- *Sustancias no húmicas*, que consisten en compuestos químicamente definidos como son carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos, grasas, lípidos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre otros. La mayoría de estos compuestos son degradados rápidamente tanto en suelos como en sedimentos por la microflora.

- *Sustancias húmicas*, que se encuentran en todos los ambientes terrestres y acuáticos, y pueden considerarse como un grupo de sustancias orgánicas heterogéneas constituidas por un conjunto de moléculas altamente polimerizadas, de peso molecular relativamente alto y con un color entre amarillo y negro. Estas

sustancias amorfas y con propiedades coloidales e hidrofílicas muy marcadas, están constituidas principalmente por C, H, O y N. Contienen estructuras moleculares alifáticas y aromáticas y muestran alta capacidad de intercambio catiónico así como gran cantidad de grupos ácidos (carboxílicos y fenólicos).

Otra definición posible para ellas es considerarlas como complejas macromoléculas de unidades aromáticas con uniones de aminoácidos, péptidos, aminoazúcares, ácidos alifáticos y otros constituyentes orgánicos (Kononova, 1966; Flaig y col., 1975; Stevenson, 1982), donde los anillos aromáticos son del tipo di y trifenólico, conteniendo grupos OH libres y dobles uniones quinona con puentes de O, S y átomos de N, así como NH, CH₂ y otros grupos (Stevenson, 1985).

Para el estudio de las propiedades químicas y coloidales de la materia orgánica en el suelo y más concretamente las sustancias húmicas, es necesario su aislamiento de la matriz inorgánica que está asociada a ella mediante la extracción química con disolventes. En base a su solubilidad, las sustancias húmicas pueden clasificarse en tres grupos universalmente reconocidos:

- o Ácidos húmicos (AH): Extraíbles en medio alcalino y que precipitan al acidificar. La base de su estructura está formada por un gran grupo de estructuras aromáticas y cadenas alifáticas. Poseen diversos grupos funcionales tales como hidroxilos, carboxilos, metoxilos, fenólicos, etc. Son de color pardo oscuro y peso molecular muy alto.
- o Fracción fúlvica (FF): Extraíble en medio alcalino y cuyos componentes permanecen en disolución después de acidificar el extracto. Poseen una estructura relativamente similar a la de los AH pero con un menor peso molecular. También están menos polimerizados y contienen una mayor proporción de cadenas alifáticas, a la vez que son más ricos en grupos fenólicos, hidroxílicos, carboxílicos y cetónicos.
- o Huminas: No son extraíbles con disoluciones alcalinas. Debido tanto a su insolubilidad como a su naturaleza macromolecular, la humina ha sido la fracción húmica menos estudiada de todas. Gracias a técnicas como la resonancia magnética nuclear (¹³C-RMN) en estado sólido, se ha podido dilucidar en parte su composición y estructura. Dependiendo de la naturaleza del material húmico, se considera en general que las huminas poseen una estructura muy similar a la de los AH, tanto por su composición elemental como

por su contenido en grupos funcionales, diferenciándose de éstos en una menor aromaticidad, debida al mayor contenido de polisacáridos alifáticos presentes en la estructura de las huminas (Hatcher y col., 1985).

En el período comprendido entre 1730 y 1930, fueron apareciendo los términos con que se conocen las distintas fracciones húmicas que se han ido aislando en base a su solubilidad: ácidos húmicos, fracción fúlvica, huminas, ácidos úlmicos, ulmina, ácido crénico, ácido apocrénico, ácido himatomelánico, ácidos húmicos pardos y grises, etc. Gran parte de esta terminología ha ido desapareciendo con el tiempo, excepto las fracciones que conocemos actualmente y que han perdurado, como son AH y FF.

El origen de las sustancias húmicas se ha tratado de explicar históricamente mediante diversas teorías, las cuales se basan por un lado en la procedencia de los materiales de partida de la materia orgánica, que pueden ser tanto de origen vegetal como microbiológico, y por otro, de una compleja combinación de reacciones influenciadas por muchos factores tanto químicos, biológicos y ambientales, que tienen lugar durante el proceso de humificación.

En la primera de ellas se incluiría el trabajo de Maillard (1916), el cual intentó sintetizar sustancias húmicas haciendo reaccionar aminoácidos con azúcares reductores. La experiencia no tuvo mucho éxito, pero su idea de que el *humus* se forma a partir de sustancias más simples procedentes de la descomposición de residuos vegetales por procesos sintéticos muy complejos, no fue desacertada. No obstante, el concepto de humificación de Trusov (revisado por Kononova, 1966) se acerca más aún al concepto que tenemos actualmente. Este autor postuló la siguiente secuencia en el proceso de humificación: (1) descomposición hidrolítica de restos de plantas seguido de síntesis de sustancias simples de naturaleza aromática; (2) oxidación de estas últimas por enzimas microbianas para formar hidroquinonas y, (3) condensación de las quinonas y transformación en productos de color pardo-oscuro característico de las sustancias húmicas.

Otra de las teorías, llamada *ligno-proteica*, surgió en años posteriores y se caracterizó por la tendencia general entre los investigadores (Fuchs, 1931; Hobson y Page, 1932; Waksman, 1936) a considerar la lignina como principal fuente de sustancias húmicas que, durante la humificación, experimentarían un gran número de transformaciones complejas, especialmente fisicoquímicas como la condensación y la oxidación. A favor de esta teoría, adoptada durante algunas décadas, se exponían

consideraciones tales como la naturaleza semejante de los AH y la lignina, basada en el hecho comprobado de que por oxidación alcalina la lignina se transforma en compuestos de aspecto parecido a las sustancias húmicas, así como también a la relativa resistencia de ambos compuestos al ataque microbiano y al hecho de que son solubles en álcali y precipitan en medio ácido.

A mitad del siglo XX, la *teoría ligno-proteica* de formación del *humus*, popularizada sólo dos décadas atrás por Waksman y otros, había sido rechazada por muchos investigadores (Kononova, 1966; Flaig, 1966 y Flaig y col., 1975). Según éstos, serían las quinonas, sintetizadas por una parte por los microorganismos y provenientes de la lignina por otra, las principales materias primas de las sustancias húmicas, originándose así la *teoría polifenólica* de formación de estas sustancias. Según este modelo, el primer paso consiste en la ruptura de todos los biopolímeros de las plantas (incluida la lignina) a sus correspondientes unidades estructurales monoméricas (sustancias derivadas del fenilpropano). A continuación, las cadenas de lignina son oxidadas y demetiladas, transformándose los polifenoles en quinonas por medio de enzimas polifenoloxidasas. En último término, las quinonas reaccionan con compuestos nitrogenados como aminoácidos para formar polímeros coloreados de naturaleza húmica.

En la práctica, tanto la *teoría ligno-proteica* como la *polifenólica* pueden ser operativas, pero no en la misma extensión o en el mismo orden de importancia, sino dependiendo de los ambientes a los que nos refiramos. Por ejemplo, es poco probable que la lignina sea la precursora de sustancias húmicas en sedimentos marinos puesto que se piensa que las sustancias húmicas marinas son autóctonas y contienen fitoplancton y no lignina, siendo en cambio este biopolímero, uno de los principales componentes de la biomasa terrestre. De este modo, la importancia de los precursores específicos de las sustancias húmicas en diferentes ambientes depende no sólo de su distribución en la biosfera, sino también de su relativa estabilidad en aquellos ambientes (Ertel y col., 1988).

1.2. Estructura de las sustancias húmicas: problemática de elucidación de modelos.

La formación de sustancias húmicas puede estar regida por cualquiera de los modelos descritos anteriormente. El número de moléculas precursoras es enorme, y el número de combinaciones según las cuales cabe imaginarlo mucho mayor. Por lo tanto, la generación de estas sustancias puede deberse a muchos tipos diferentes de

mecanismos de reacción, a pesar de que la mayoría de investigadores están a favor del mecanismo basado en la condensación de compuestos fenólicos y quinonas (Stevenson, 1994).

La estructura química de las sustancias húmicas ha sido uno de los temas de investigación más controvertido de las últimas décadas para los investigadores de la ciencia del suelo, y son pocos los modelos capaces de describir adecuadamente la complejidad estructural de estas sustancias ubicuas en la naturaleza. Burdon (2001) afirma que los modelos tradicionales propuestos para las estructuras de las sustancias húmicas que se basan en las teorías de formación y en las reacciones químicas que se producen, no son realistas ya que no existen en el suelo como tales y que la materia orgánica consiste en una mezcla compleja de productos de degradación de restos vegetales y compuestos de síntesis metabólica de microorganismos presentes en el suelo, que se someten a un proceso de humificación que debe ser explicado como una combinación de métodos químicos y biológicos.

Aunque resulta aún imposible dilucidar exactamente la estructura de las sustancias húmicas, sí es posible en cambio hacer hipótesis sobre los posibles modelos estructurales basándose en datos derivados de procesos degradativos o de pirólisis, estudios espectroscópicos, composición elemental, contenido de grupos funcionales, la alifaticidad y la aromaticidad de estas sustancias, así como de su comportamiento e interacción química entre partes de su misma estructura en disolución.

Desde el punto de vista histórico, podemos clasificar los intentos para conocer la estructura de las sustancias húmicas en varias etapas (Ziechmann, 1988):

- Fijación de conceptos y una nomenclatura extensiva (1780-1850).
- Presentación de la primera fórmula estructural detallada (1920-1970).
- Distintas tentativas para derivar modelos sin detalles químicos (1950-1960).
- Aplicación de técnicas analíticas modernas para un mejor entendimiento de la estructura (hasta la actualidad).

En la actualidad, la discusión entorno al tamaño y la conformación de la estructura molecular de las sustancias húmicas ha generado tres vertientes contrastadas (Clapp y Hayes, 1999), que varían fundamentalmente según la naturaleza de estas sustancias, en los datos obtenidos según las técnicas experimentales empleadas y en su comportamiento en disolución.

La primera de ellas es la más extendida y se basa en las teorías de formación aceptadas como la *teoría polifenólica* y la *ligno-proteica*. Defiende que las sustancias húmicas son estructuras macromoleculares de conformación variable dependiendo de las características del medio en que están solubilizadas. Tanto la degradación como los procesos de síntesis que se dan en la humificación de la materia orgánica, tienen una gran importancia en la formación de las sustancias húmicas y es aceptado que la lignina juega un papel muy importante en la misma cuando los restos vegetales son transformados. El esqueleto principal de las sustancias húmicas está formado por uniones C-C que derivan de la degradación de la lignina y de la combinación con otras moléculas presentes en el suelo como amino ácidos y proteínas, que le confieren el N que no posee la lignina y que es detectado en las sustancias húmicas.

Otra vertiente se basa en considerar a las sustancias húmicas como asociaciones moleculares formadas por moléculas "relativamente pequeñas" que están ligadas entre si por medio de interacciones débiles. Esto podría explicar la gran cantidad de compuestos que se han detectado en los procesos de purificación de los AH como carbohidratos, celulosas y hemicelulosas, además del alto grado de polidispersidad obtenido, que varía enormemente según la técnica utilizada así como el tipo de suelo del que se extraen. El uso de resinas como DAX-8 y polivinilpirrolidona (PVP) en la purificación de las sustancias húmicas, puede decrecer el número de estas sustancias haciendo pensar que no pertenecen propiamente a la estructura y que están enlazadas covalentemente a las fracciones húmicas (Häusler y Hayes, 1996).

La más reciente se basa en que las sustancias húmicas pueden tener restos moleculares de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica en su estructura, siendo los primeros los que inducen la solubilidad y siendo esta mayor cuanto más elevada sea la carga iónica del disolvente. Aunque haga falta disolver con álcali para obtener un mayor porcentaje de sustancias húmicas (Stevenson 1994), estas pueden estar en disolución hasta pH cercano a 2, a partir del cual, los restos acídicos que forman parte de las sustancias húmicas como grupos carboxílicos y fenólicos, se puedan protonar favoreciendo la formación de partes hidrofóbicas dando lugar a una estructura de tipo "*miscelar*" o "*pseudomiscelar*" que da lugar a la separación conocida para los AH (Sutton y Sposito, 2005).

1.3. Aislamiento de las sustancias húmicas.

1.3.1. Extracción.

La extracción es el primer paso para aislar y caracterizar las sustancias húmicas, debiéndose extraer en la forma menos inalterada posible y evitando la co-extracción de otro tipo de sustancias con características no húmicas tales como carbohidratos, grasas y aminoácidos, que interfieren su correcta caracterización (Ciavatta y col., 1988).

Los procedimientos de extracción constituyen la fase más crítica en el estudio de las sustancias húmicas, habiéndose esto estudiado intensamente desde hace más de dos siglos. El extractante ideal debería solubilizar estas sustancias sin producir cambios en su estructura molecular y propiedades (Schnitzer, 1978). Según Stevenson (1994), el método de extracción idóneo debe cumplir los siguientes objetivos:

- El método utilizado no debe alterar la materia orgánica aislada.
- Las sustancias húmicas obtenidas deben estar libres de impurezas inorgánicas como pueden ser arcillas y cationes polivalentes.
- La extracción se puede considerar completa si el peso molecular medio de la fracción obtenida es representativo de la muestra.
- El método debe ser universal para cualquier tipo de sustrato.

El gran número de condiciones ensayadas es la mejor demostración de que la extracción de sustancias húmicas es un problema aún no del todo resuelto. Según las características de cada material, hay que adaptar el método extractivo buscando un rendimiento máximo en la obtención de dichas sustancias, pero a la vez minimizando la posible interferencia de otros componentes.

1.3.1.1. Factores que influyen en la extracción.

Concentración y tipo de extractante.

Uno de los parámetros que influye de modo importante en la solubilidad de la materia orgánica de sustratos orgánicos es el tipo de extractante. De todos los

extractantes empleados es el NaOH 0,1 M el que más se ha utilizado, ya que permite obtener altos rendimientos. Este extractante ha sido usado por numerosos investigadores tales como Giusquiani y col. (1994) para suelos, y también para composts procedentes de lodos de depuradora, purines de cerdo o residuos sólidos urbanos (RSU) (Chefetz y col., 1996; Bernal y col., 1998). El $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 M se ha utilizado para la solubilización de sustancias húmicas, consiguiéndose generalmente menores rendimientos de extracción que con los extractantes alcalinos, tal y como comprobaron García y col. (1993a) trabajando con turba. Dicho extractante también ha sido empleado para solubilizar la materia orgánica de compost de RSU (García y col., 1992a y b), así como de distintos tipos de suelos (Fujitake y col., 1998). Otro extractante empleado con frecuencia es la mezcla NaOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a concentración 0,1 M, que ha sido aplicada tanto sobre suelos (Tomar y col., 1992) como sobre turbas (Tonelli y col., 1997).

La apropiada concentración del extractante ha sido igualmente objeto de numerosos estudios, habiéndose utilizado más frecuentemente en el caso del NaOH la concentración 0,1 M (Miikki y col., 1997; Tomati y col., 2001), si bien algunos como Piccolo y Mirabella (1987) utilizaron la concentración 0,5 M, e incluso, hay quienes han experimentado la concentración 1 M, pero en este caso con KOH, como es el caso de Ouatmane (2000).

Relación de extracción.

Otro de los factores que puede afectar a la solubilidad de la materia orgánica es la relación de extracción (P/V), que relaciona el peso de sustrato y el volumen del agente extractante utilizado, ya que influye en la concentración de la materia orgánica líquida que puede obtenerse en el proceso de extracción. Mientras que para suelos la P/V recomendada por la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS) es la 1/10 como relación de extracción aplicable al aislamiento de sustancias húmicas, para otros materiales puede ser necesario un aumento de la proporción de extractante, sobre todo, cuando pueda esperarse una elevada solubilización de materiales que sature la disolución, antes de que se extraiga toda la materia orgánica de que el disolvente es capaz. Por este motivo, Cegarra y col (1974) emplearon distintos valores de P/V utilizando como sustratos estiércoles, turbas y suelos calizos pobres en materia orgánica enmendados con estos materiales. En la obtención de sustancias húmicas de materiales muy ricos en materia orgánica tales como turbas, lignitos, estiércoles y composts, el valor de P/V generalmente más utilizado ha sido 1/20

(García y col., 1992a y b; Cegarra y col., 1994; Bernal y col., 1998; Caravaca y col., 2006).

Tiempo de extracción.

También, el tiempo utilizado en la extracción ha sido objeto de muchas investigaciones dependiendo del material orgánico. Cegarra (1978) estudió la influencia de este factor y observó que, a medida que aumentaba el tiempo de extracción desde 0,5 hasta 24 horas, también lo hacía el porcentaje de carbono extraído a partir de turba y un estiércol ovino. Sánchez-Monedero y col. (1996) utilizaron un tiempo de extracción de 4 horas sobre lignitos, estiércoles y composts de distinta procedencia, mientras que Francioso y col. (1998) emplearon 6 horas para turba y García y col. (1993b) 12 horas para lignito. Otros investigadores han utilizado un tiempo de 24 horas, tanto en materiales jóvenes como composts (Tomati y col., 2001) como también, en materiales altamente humificados tales como turbas y lignitos (Ayuso y col., 1997). Según el método recomendado por la IHSS para el aislamiento de sustancias húmicas, 4 horas es tiempo suficiente para solubilizar la mayor parte de la materia orgánica presente en suelos.

Temperatura de extracción.

En materiales ricos en materia orgánica como estiércoles, turbas, lignitos y composts, el rendimiento de extracción dependerá en gran medida de las condiciones en las que se trabaje, siendo la temperatura un factor relevante. De este modo, Cegarra y col. (1974) estudiaron el efecto de este parámetro sobre turba y estiércol ovino, con un intervalo de variación que osciló entre 30° y 80°C. García y col. (1994) también analizaron el efecto de la temperatura sobre la extracción de sustancias húmicas de lignito empleando temperaturas de 20°, 50° y 80°C, y Ouatmane (2000) estudió igualmente este efecto sobre la obtención de materia orgánica a partir de composts elaborados con serrín, estiércol animal y pulpa de café, utilizando temperaturas que oscilaron entre 25° y 80°C. En general, todos estos estudios concluyeron demostrando que el incremento de temperatura durante la extracción, independientemente del sustrato y del extractante utilizado, incrementa el rendimiento de extracción.

1.3.2. Fraccionamiento.

El principal objetivo que se persigue cuando se fracciona los extractos de sustancias húmicas es reducir su heterogeneidad para facilitar la aplicación de las distintas técnicas analíticas y se basa en la separación de sus componentes aprovechando alguna propiedad relacionada con su composición molecular.

Se han empleado diferentes procedimientos para el fraccionamiento de las sustancias húmicas contenidas en la materia orgánica soluble, siendo el método más utilizado el que se basa en la variación del pH, dada la distinta solubilidad de tales sustancias según que el medio sea ácido o alcalino. De este modo, disminuyendo el valor de pH del extracto, generalmente obtenido en medio alcalino, hasta valores próximos a 2, se consigue la separación convencional en dos fracciones: AH y FF.

Sequi y col. (1986) introdujeron una modificación en la metodología convencional utilizada para fraccionar los materiales húmicos, cuyo objetivo era distinguir dos fracciones dentro de FF: la no humificada (NH) y los verdaderos ácidos fúlvicos (AF). Tal fraccionamiento se efectúa mediante el uso de un gel de resina de PVP empaquetado en columna, a través del cual se hace pasar la fracción FF, de manera que la componente NH atraviesa la columna, mientras que los AF quedan retenidos debido a sus características fenólicas.

Andersen y Sowers (1968) mostraron cómo la resina de PVP forma puentes de hidrógeno principalmente con grupos fenólicos, hidroxilo y carboxilo (Figura 1) y, posteriormente, otros investigadores (Lowe, 1975 y Watanabe y Kuwatsuka, 1992) comprobaron que tras hacer pasar la fracción FF a través de esta resina, la componente retenida o adsorbida (considerada como AF) está compuesta por compuestos polifenólicos y por sustancias caracterizadas por contener un gran número de anillos aromáticos y grupos carboxilo, mientras que la fracción no adsorbida (NH) está constituida principalmente por carbohidratos, péptidos, aminoazúcares, aminoácidos y otros compuestos de naturaleza no húmica.

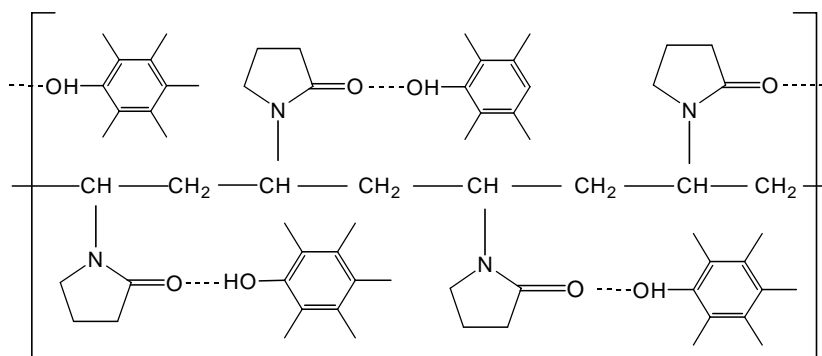


Figura 1. Estructura básica de la resina de Polivinilpirrolidona.

En la Figura 2 se muestra un esquema actualizado de fraccionamiento de sustancias húmicas basado en la variación del pH y en el uso de PVP.

Otras técnicas de fraccionamiento también utilizadas se fundamentan en las diferencias en el tamaño molecular. Puede citarse al respecto la cromatografía de elución sobre gel, la ultrafiltración y la ultracentrifugación, siendo éstas dos últimas aplicables también tanto para la concentración como para la purificación de las sustancias húmicas. Basadas en la carga eléctrica de las moléculas, se han utilizado también la electroforesis de isoelectroenfoque y la isotacoforesis (De Nobili y col., 1999)

1.3.3. Purificación.

La purificación de las sustancias húmicas tiene como finalidad la eliminación de carbohidratos, proteínas, lípidos, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y sales minerales, que son co-extraídas con las mismas, antes de proceder a su caracterización.

El uso de mezclas de ácidos minerales como HCl-HF ha sido propuesto por numerosos autores (Kumada, 1983; Kakezawa y col., 1992; Fujitake y col., 1998) con el fin de eliminar los componentes minerales de las sustancias húmicas extraídas tanto en suelos como en carbones fósiles y en composts. La efectividad del método se basa en la utilización del HF, debido a su capacidad para disolver minerales arcillosos hidratados y formar complejos con cationes di- y trivalentes. Según esta técnica, tanto compuestos orgánicos de bajo peso molecular como parte de las sales minerales son eliminados durante el proceso, con el inconveniente de que ni los metales fuertemente adsorbidos o complejados ni muchos hidróxidos pueden ser del todo separados.

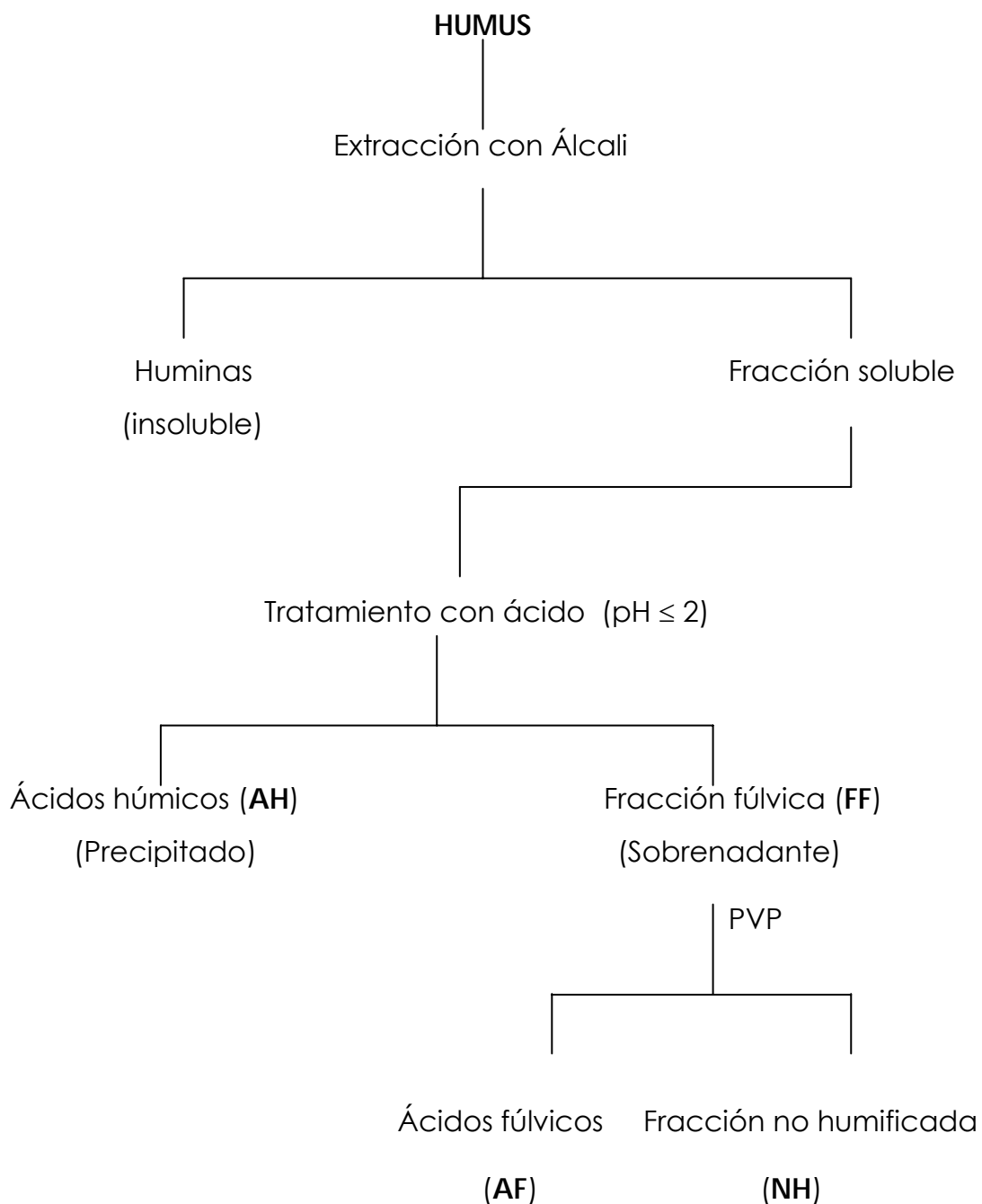


Figura 2. Esquema del fraccionamiento de las sustancias húmicas.

Las impurezas de naturaleza orgánica (carbohidratos, proteínas, etc.) son el otro tipo de interferentes que pueden ser co-precipitados o co-adsorbidos junto con las sustancias húmicas. Estos compuestos podrían estar ligados covalentemente a la estructura de los AH, puesto que para su eliminación tienen que ser empleados

métodos de separación bastante exhaustivos. La eliminación de lípidos como grasas, ceras, resinas, etc., se puede llevar a cabo con disolventes tales como el éter o mezclas alcohol-benceno. Se puede mejorar la eficacia del método usando la extracción de un gas supercrítico como el n-pentano (Schnitzer y col., 1986). También ha sido usada la ebullición de los AH en agua para la eliminación de polisacáridos, polipéptidos y pequeñas cantidades de ácidos fenólicos y aldehídos.

Los métodos de diálisis y electrodiálisis son bastante adecuados para purificar los AH, pero en cambio para la FF son poco eficaces, ya que al mismo tiempo que las sustancias impurificantes atraviesan las membranas, lo hacen también en gran medida muchos compuestos orgánicos de bajo peso molecular, característicos de los AF.

Una opción muy generalizada para la purificación de sustancias húmicas es someterlas a diálisis con una disolución de agua desionizada hasta que esté libre de iones cloruro, sodio y potasio, y seguido de una posterior liofilización (Ayuso y col., 1996; Trubetskaya y col., 2001).

1.4. Caracterización de las sustancias húmicas.

El hecho de que las sustancias húmicas estén constituidas por una compleja mezcla de moléculas, hace su estudio particularmente difícil si lo comparamos con el de moléculas discretas. La composición de estas sustancias varía en gran medida dependiendo del material de partida y del método de extracción, por lo que para una buena caracterización de las mismas es necesario normalmente aplicar más de un método analítico.

Entre las técnicas más comunes para su caracterización podemos destacar el análisis elemental, con el que generalmente se determinan carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno, así como el análisis del contenido de grupos funcionales tales como hidroxilos, carboxilos, carbonilos y la acidez total.

El fraccionamiento según su tamaño molecular mediante técnicas de cromatografía sobre gel en columna, o el estudio espectroscópico en el visible, ultravioleta e infrarrojo son también técnicas muy comúnmente empleadas. También se pueden caracterizar por métodos degradativos, que a su vez pueden ser

degradaciones oxidativas, reductivas, térmicas, etc.

Actualmente se ha ampliado el conocimiento de la naturaleza y estructura química de las sustancias húmicas, gracias al continuo y rápido progreso que se está llevando a cabo en el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas analíticas. Algunas de estas técnicas con las que podrán dilucidarse muchas incógnitas sobre estructura, composición química, origen y mecanismo de formación de estas sustancias son:

- Análisis elemental en combinación con la determinación de los grupos funcionales.
- Espectroscopia de infrarrojo.
- Técnica combinada de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS).
- Cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (GC/MS).
- Combinación del bombardeo atómico rápido y espectrometría de masas (FAB/MS), técnica usada cuando los productos de degradación no sean sensibles a GC/MS.
- CP/MAS (Polarización cruzada/Rotación de ángulo mágico) ^{13}C -RMN.
- ^1H -RMN en estado sólido, para complementar los espectros de CP/MAS.

Hasta la fecha, estas dos últimas técnicas espectroscópicas de RMN están siendo muy utilizadas debido a que permiten una mejor percepción de la estructura química de los AH, pudiendo proporcionar las “huellas dactilares” del carbono e hidrógeno de los compuestos constituyentes de una muestra sólida de AH sin deteriorarla.

1.5. Materiales utilizables como fuentes de sustancias húmicas.

El sustrato tradicionalmente utilizado por excelencia para el aislamiento y caracterización de sustancias húmicas ha sido el suelo. No obstante, hay gran cantidad de materiales que también son susceptibles de ser usados como materia prima para el estudio de las sustancias húmicas, entre los que cabe citar carbones fósiles, turbas, estiércoles y composts.

1.5.1. Carbones.

Son materiales que se han formado gracias a la acumulación de grandes cantidades de sedimentos de origen vegetal y la subsiguiente descomposición y consolidación de los mismos durante largos periodos de tiempo. Podríamos distinguir dos etapas en la formación de estos materiales. En una primera fase se formaron los depósitos de turba y en una segunda, estos depósitos se cubrieron por sedimentos y fueron sometidos a altas temperaturas (>200 °C) y grandes presiones tectónicas. A lo largo de los distintos períodos geológicos, se produjeron sucesivamente formaciones de lignito y carbones pardos, carbones bituminosos y finalmente antracita.

El lignito puede considerarse como un carbón de bajo rango, clasificable entre los carbones pardos, de color entre pardo y negro, mientras que la leonardita debe considerarse como una forma oxidada de carbones del tipo del lignito. Otras formas más envejecidas de carbón son los carbones bituminosos y la antracita.

Desde el punto de vista de su utilización para la obtención de sustancias húmicas, se pueden clasificar los carbones según la proporción de carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre que contienen. Así, el contenido de C aumenta desde valores cercanos al 70 % en carbones de bajo rango hasta el 95 % o más en antracitas, variando el porcentaje de O desde el 22 % en carbones de bajo rango hasta un 2 % en antracitas (Lawson y Stewart, 1989).

Distintos investigadores como García y col. (1992b) y Ayuso y col. (1997) compararon los AH extraídos de leonardita con los procedentes de composts elaborados a partir de RSU y lodos de depuradora, respectivamente, mostrando cómo los AH derivados de los composts poseían una mayor naturaleza alifática, mayor contenido de N, menor grado de oxidación y una composición más heterogénea que los obtenidos de la leonardita.

1.5.2. Turbas.

Son materiales húmicos resultantes de la acumulación de plantas, sus residuos y productos de transformación durante milenios. Se trata de materiales que contienen hasta el 97 % de materia orgánica, elevada humedad (hasta el 90 % de su peso seco) y una composición que se puede situar entre las del lignito y la madera (Wikander y Nordén, 1988). Se encuentran en depósitos superficiales, llamados "suelos orgánicos", "bog", "histosoles", etc., cubriendo aproximadamente 500 millones de hectáreas en el mundo (Bramryd, 1980).

Se han hecho numerosos intentos para encontrar un método capaz de medir el grado de humificación de las turbas, sin que se haya podido expresar de forma exacta la proporción de sustancias húmicas que contienen. El principal problema para obtener MOS a partir de las turbas es la no selectividad de las sustancias húmicas cuando se tratan con agentes alcalinos, ya que abundante materia orgánica no humificada se extrae conjuntamente con las verdaderas sustancias húmicas. Este inconveniente se puede obviar solubilizando en una primera extracción los materiales no húmicos como lípidos, fenoles solubles y azúcares (Walmsley, 1973).

Se sabe que las turbas con menor estado de descomposición tienen por lo general menor contenido de cenizas, mayores contenidos en agua y en fibra vegetal, así como una menor densidad. Este tipo de turbas son las denominadas "Sphagnum" u "oligotróficas". En cambio, las turbas con un mayor estado de descomposición se caracterizan por tener una mayor densidad así como un mayor contenido de cenizas, llamadas "herbáceas" o "eutróficas".

García y col. (1993a) y Cegarra y col. (1994) aislaron y caracterizaron los AH procedentes de dos tipos diferentes de turba (Sphagnum y Carex), evaluando cómo influyen en la extracción de estas sustancias el tipo de extractante y la temperatura de extracción, respectivamente. Francioso y col. (1998) también estudiaron los AH de turba, pero en este caso mediante la separación por tamaños moleculares.

1.5.3. Estiércoles y composts.

Los residuos orgánicos agrícolas y agropecuarios, se han eliminado tradicionalmente mediante su vertido al suelo y en algunos casos por incineración. Los estiércoles y los composts se caracterizan por ser materiales de naturaleza orgánica obtenidos por fermentación aeróbica más o menos controlada de residuos de origen animal y/o vegetal. Transcurrido un cierto tiempo de estabilización de dichos residuos, suficiente para considerarlos como maduros, pueden utilizarse en agricultura como fertilizantes y enmendantes del suelo, contribuyendo a mejorar las características físico-químicas y biológicas del mismo.

La diferencia operativa entre ambos grupos de materiales se relaciona únicamente con el proceso de manejo y control de su fermentación. Así, si la fermentación se produce en condiciones controladas, manipulando adecuadamente los parámetros que habitualmente influyen en el proceso biooxidativo como son: temperatura, humedad, aireación, pH, relación C/N, etc., dicho proceso se llama

compostaje, y al producto obtenido se le denomina compost. Por el contrario, la biotransformación espontánea en condiciones predominantemente aeróbicas de las deyecciones animales (mezcladas con ciertas proporciones de residuos vegetales), con escasa o nula manipulación, conduce a lo que tradicionalmente ha recibido el nombre de estiércoles.

Se han utilizado materiales muy diversos para la producción de composts, tales como basuras urbanas, excrementos animales, turbas, carbones, desechos vegetales y de la industria agroalimentaria, lodos de aguas residuales urbanas, así como mezclas de todos ellos.

Dentro de los composts se pueden distinguir varios tipos, entre los que cabe destacar:

- Vermicompost: Es un compost originado mediante la biotransformación de residuos orgánicos tales como lodos de depuradora, residuos sólidos urbanos, estiércoles animales o desechos vegetales, en nuevos materiales más humificados para uso agrícola, producida mediante la actividad biológica de diversas especies de lombrices como *Eisenia foetida* y *Lumbricus rubellus*. El vermicompost es un biofertilizante asimilable, rico y equilibrado, que se presenta como un producto disgregado, ligero e inodoro, rico en enzimas y microorganismos. Hervas y col. (1989) caracterizaron los AH procedentes de vermicomposts de distinta procedencia (RSU, lodos de depuradora y estiércoles animales) y observaron que eran de calidad similar a los procedentes de composts de RSU.
- Composts de RSU: Este tipo de composts está constituido por un conjunto de materiales muy heterogéneos tales como residuos domésticos, residuos sanitarios y aguas residuales o lodos de depuradora. Senesi y col. (1996) compararon los AH de distintos composts elaborados con RSU caracterizados por numerosos investigadores, con los AH de suelos, observando cómo los contenidos de hidrógeno, azufre y nitrógeno de los composts eran bastante superiores a los registrados en suelos, con un menor contenido en grupos funcionales acídicos (COOH y OH fenólicos). Todo ello sugiere que posiblemente el material proteínico sea incorporado en la fracción de AH de este tipo de composts durante su compostaje, y que dichos

AH poseen una menor condensación y grado de humificación que los procedentes del suelo.

- Composts de residuos agrícolas, ganaderos e industriales: Dentro de este tipo de residuos se incluyen los restos de poda, serrín, materias orgánicas sólidas y líquidas procedentes de la actividad animal, y cualquier material resultante de un proceso de fabricación o transformación industrial que no se aproveche. Bernal y col. (1998) trabajaron con composts elaborados a partir de distintos residuos tales como paja de maíz, residuo de algodón, lodos de depuradora o alpechín, evaluando la madurez alcanzada en cada uno de ellos por medio de la evolución durante el compostaje de las fracciones AH y FF. Observaron cómo en la mayoría de los composts, el cociente entre ambas fracciones se incrementaba durante el compostaje, sugiriendo este hecho la posible humificación experimentada por la materia orgánica.

1.6. Compostaje de residuos orgánicos.

El compostaje es una tecnología de bajo coste que permite transformar residuos y subproductos orgánicos en materiales biológicamente estables que pueden utilizarse como enmendantes y/o abonos del suelo y como sustratos para cultivo sin suelo, disminuyendo el impacto ambiental de los mismos y posibilitando el aprovechamiento de los recursos que contienen. Se define como un proceso bioxidativo controlado, que se desarrolla sobre sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido, debido a la actividad secuencial de una gran diversidad de microorganismos. Implica el desarrollo de una fase termofílica que genera temporalmente fitotoxinas, siendo productos de la biodegradación el dióxido de carbono, agua, minerales y una materia orgánica estabilizada denominada compost, con ciertas características húmicas y libre de compuestos fitotóxicos y agentes patógenos (Zucconi y de Bertoldi, 1987).

Lo anteriormente definido significa que el proceso:

- es bioxidativo, por tanto biológico, lo que diferencia al compostaje de otros tratamientos de tipo físico o químico, desarrollándose una actividad eminentemente aeróbica.

- es controlado, lo que indica la necesidad de una monitorización y control de parámetros durante el desarrollo del mismo, diferenciándolo de los procesos naturales no controlados. Parámetros tales como la temperatura, humedad y oxigenación, junto a la definición previa de la composición del sustrato, inciden enormemente en el desarrollo del proceso.

- tiene lugar sobre sustratos orgánicos en fase sólida, generalmente heterogéneos, que actúan como soporte físico y matriz de intercambio, fuente de nutrientes y agua necesarios para el metabolismo microbiano, aporta microorganismos endógenos, retiene los residuos metabólicos generados durante su desarrollo y actúa como aislante térmico del sistema (Finstein y Hogan, 1993).

- se desarrolla a través de una fase termofílica, en la que se registra una fuerte liberación de energía calorífica que eleva la temperatura, principal indicador de la dinámica del proceso, de forma que una lenta o escasa elevación de la misma debe interpretarse como un desarrollo no favorable de éste y/o un deficiente control de los factores que lo rigen. Estas temperaturas termofílicas, superiores a 40°C, que se producen en las primeras etapas del compostaje, disminuyen posteriormente durante la llamada fase de estabilización (Figura 3).

- genera temporalmente sustancias fitotóxicas, siendo la producción generalmente menor y menos duradera con sustratos heterogéneos y bajo condiciones claramente aeróbicas. Una fitotoxicidad persistente durante el compostaje, indica un deficiente desarrollo del proceso, generalmente atribuible a insuficiente oxigenación.

- libera dióxido de carbono y agua a la vez que se generan sustancias minerales, como principales productos de la biodegradación. Idealmente, los productos finales de un sistema de compostaje bien manejado son dióxido de carbono, vapor de agua, calor, materia orgánica estabilizada y amoníaco, aunque la proporción de éstos varía con la disponibilidad de carbono y nitrógeno en el residuo y con las condiciones en que se desarrolla el proceso en cada etapa del mismo (Keener y col., 1993).

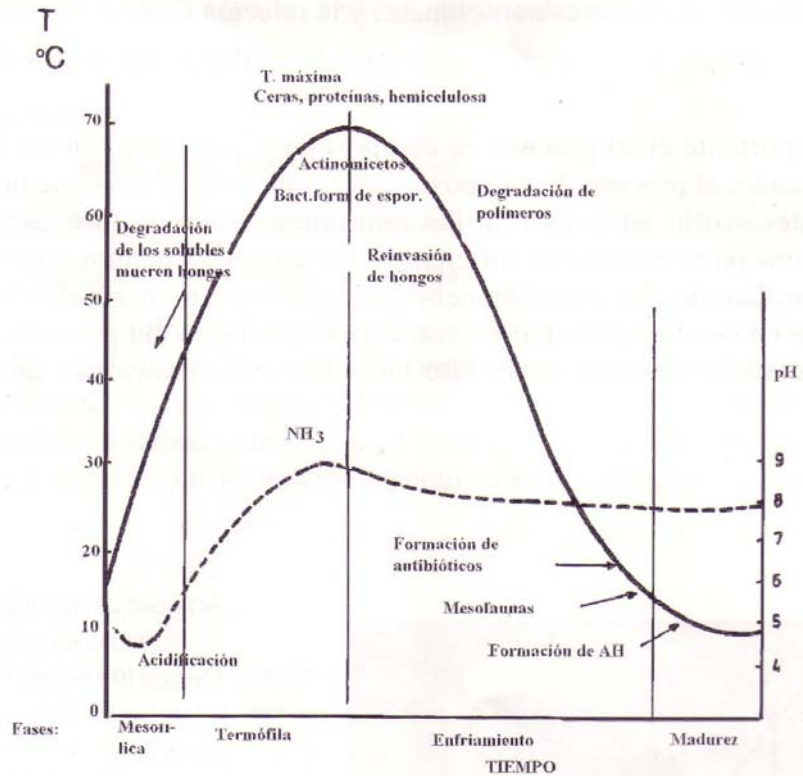


Figura 3. Evolución de la temperatura (—) y del pH (---) durante las diferentes etapas del compostaje (Costa y col., 1991).

1.7. Utilización de los residuos orgánicos en agricultura.

La adición de materia orgánica al suelo al modo tradicional, en forma de estiércoles u otros residuos orgánicos generados en las propias explotaciones agrícolas y ganaderas, a fin de mejorar la fertilidad del mismo y restituir los elementos nutritivos extraídos por los cultivos, ha ido perdiendo importancia al buscarse mayores rendimientos de producción, relegando así crecientemente al suelo a un mero soporte del cultivo. De este modo, se han ido sustituyendo los aportes orgánicos por fertilizantes minerales, produciendo la ruptura del frágil equilibrio de los suelos agrícolas y desembocando en una pérdida paulatina de su calidad biológica. Esto se produce mayoritariamente en la agricultura intensiva, cuya práctica generalmente conlleva reducción de los niveles de materia orgánica en el suelo y degradación de la estructura del mismo, con aumento también de su compactación y exaltación de los fenómenos erosivos.

Por otra parte, es bien sabido que la materia orgánica adicionada al suelo no puede competir con los fertilizantes minerales ni en la cantidad ni en el grado de asimilabilidad de los nutrientes aportados, ya que los de origen mineral son mucho más

solubles y fácilmente disponibles para la planta y, por tanto, satisfacen las necesidades nutricionales puntuales más efectivamente que el aporte orgánico de nutrientes, aunque están también sometidos en mayor grado a fenómenos de pérdida e inmovilización en el suelo. Por el contrario, el aporte de nutrientes por la materia orgánica se produce a través de una liberación gradual, siendo así éstos menos sensibles a los fenómenos adversos de lixiviación y volatilización (caso del nitrógeno) o a la fijación, como en el caso del fósforo, cuya dinámica en el suelo viene marcada por su escasa solubilidad y disponibilidad, debido a que la mayoría de los constituyentes del suelo fijan iones fosfóricos.

La aplicación al suelo de la materia orgánica de los residuos, estabilizada e higienizada mediante compostaje, es el uso más adecuado para éstos ya que confiere al mismo una mejora en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, enriqueciéndolo simultáneamente en compuestos similares a las sustancias húmicas y en elementos nutritivos más disponibles (Dick y McCoy, 1993). Según las características del compost, puede emplearse como enmendante orgánico, que actuaría principalmente sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, o como abono, mejorando además la nutrición mineral de las plantas y ahorrando fertilizantes minerales. Para cultivos sin suelo, puede igualmente utilizarse como sustrato en horticultura y como medio de crecimiento en viveros de plantas hortícolas y arbóreas. En estos usos, el compost debe contener abundante materia orgánica estable, mostrar baja salinidad, mantener un volumen constante, una porosidad adecuada, alta capacidad de cambio catiónico y capacidad tampón, a la vez que debe ser estable frente a la descomposición, no ser fitotóxico ni contener patógenos, parásitos, ni semillas de malas hierbas (Inbar y col., 1993).

El compost puede utilizarse también para el control de determinadas enfermedades de las plantas provocadas por patógenos del suelo, de forma que su adición puede afectar a la incidencia de éstas por distintas vías. A este respecto quizá, el efecto mejor apreciado pero a la vez menos entendido, sea la influencia del antagonismo microbiológico sobre la incidencia de la enfermedad, siendo el tipo y fuente de la materia prima del compost, el propio proceso de compostaje y el medio ambiente en el cual se utiliza el compost durante el desarrollo de la planta, factores que determinan el amplio espectro de antagonismos frente a los patógenos (Hoitink y col., 1987). En este sentido, la adición de compost puede resultar una alternativa viable a la aplicación de bromuro de metilo para la desinfección del suelo. Puede igualmente utilizarse en el control de malas hierbas y para el acolchado del suelo, dado el efecto físico de esta última técnica y su incidencia sobre los factores que

favorecen el crecimiento de las malas hierbas (luz, temperatura y humedad). Debido a la acción química generada por alguno de los constituyentes del compost (ácidos orgánicos de bajo peso molecular, polifenoles, etc.), éste puede inhibir el crecimiento de las malas hierbas, tal y como señalaron Ozores-Hampton y Obreza (2000).

El compost puede igualmente utilizarse en la lucha contra la degradación del suelo, en su recuperación y prevención y son prometedores los ensayos dirigidos a evaluar la utilización de compost en técnicas de biorremediación para la descontaminación de suelos, ayudando al desarrollo de la vegetación y a la inactivación o eliminación del contaminante, tal y como se ha evidenciado en la recuperación de suelos contaminados por metales pesados (García Gómez, 2001; Clemente y col., 2006) o por plaguicidas (Cole y col., 1995). Así mismo, el compost puede ser aprovechado a modo de biofiltro en el control de malos olores y la depuración del aire (Van der Hoek y Oosthoek, 1985) y para la obtención de MOS, rica en sustancias parecidas a las húmicas, con potencial para activar el crecimiento vegetal, siendo muy común encontrar preparados líquidos extraídos de composts y estiércoles en el amplio mercado de los agroquímicos comerciales.

1.8. El caso particular de la industria extractiva del aceite de oliva en España.

El cultivo del olivo y, especialmente, la actividad de la industria oleícola asociada, generan abundantes residuos y subproductos de potencial impacto ambiental, a la vez que tienen una gran importancia económica y social en los países de la Cuenca Mediterránea, siendo España el principal país productor a nivel mundial. El olivar ocupa en España aproximadamente el 18% de la superficie total cultivada con aproximadamente 2,423.000 has., correspondiendo a Andalucía el 60% de tal superficie y una producción del 80% del total nacional de aceite de oliva, mientras que el resto se produce principalmente en Castilla La Mancha, Extremadura, Cataluña y Valencia (AAO, 2005). En el periodo comprendido entre los años 1997 y 2005 la producción media anual de aceite en España se estimó en 1.026.822 toneladas y ha sido de 984.393 toneladas en la campaña 2004/2005. En España existen 1.782 almazaras, 843 de las cuales se encuentran en Andalucía (AAO, 2005).

1.8.1. Evolución tecnológica del proceso extractivo y generación de residuos y subproductos.

Hasta finales de la década de los sesenta, la extracción del aceite de oliva en España se realizaba con el método de prensa, sistema discontinuo que genera básicamente un residuo sólido, el *orujo*, y otro líquido muy contaminante llamado *alpechín* y que resulta poco racional y operativo ya que consigue rendimientos horarios bajos, precisa más mano de obra y, por lo general, la limpieza e higiene son difíciles de conseguir (Tardáguila y col., 1996). Por otra parte, pueden producirse problemas derivados de fermentaciones que alteran la calidad del aceite obtenido. En la década de los setenta, este sistema se sustituyó por las nuevas técnicas de centrifugación en sistema continuo, mejorando el control de los procesos y la calidad del aceite. La correcta separación de la fase sólida de las líquidas por las centrífugas de tres fases, se realiza mediante la adición de agua a la pasta de aceituna con el fin de fluidificarla y lograr así un funcionamiento óptimo de la centrífuga, si bien se incrementa así el consumo de agua y, sobre todo, también el vertido final de *alpechín*, principal inconveniente de este sistema de extracción. El sector intentó paliar la problemática generada por el *alpechín*, buscando medios para su aprovechamiento y depuración, si bien no fueron considerados suficientemente eficaces ni económicamente viables, razón por la cual esta técnica de elaboración evolucionó en el sentido de diseñar instalaciones capaces de funcionar con el menor caudal posible de agua de fluidificación de la pasta.

A finales de la campaña oleícola 1991-92, se presentó el nuevo sistema de centrifugación de dos fases, también llamado ecológico, que efectúa la separación del aceite sin adición de agua al decánter o con una adición mínima, dependiendo de la humedad de la aceituna a tratar. Entre las ventajas de este nuevo sistema de extracción, cabe señalar que permite obtener un aceite cualitativamente superior debido a su mayor contenido en agentes antioxidantes, lo que le otorga una mayor estabilidad frente a los fenómenos oxidativos (Ranalli y Martinelli, 1995), consigue un caudal de trabajo similar o superior al de tres fases y una importante reducción del consumo de agua (65-70%), con el consiguiente ahorro en energía de calefacción. Sin embargo, la ventaja más importante de este sistema es que no genera *alpechín*, reduciéndose el efluente acuoso generado básicamente al agua de lavado de los aceites y, en menor cuantía, al agua de lavado de las aceitunas y limpieza general de la maquinaria, originando como subproducto únicamente el orujo de dos fases, también llamado *alperujo* (Alba y col., 1993; Hermoso y col., 1993). Como principales inconvenientes del sistema de dos fases cabe citar el aumento considerable del volumen de orujo producido, debido a la incorporación de la fracción acuosa, así como el manejo y aprovechamiento del mismo.

Más del 90% de las almazaras emplean actualmente el sistema de dos fases (Borja y col., 2004), estimándose que un 75% del aceite producido en España se obtiene por el sistema de dos fases, mientras que el resto se obtiene mayoritariamente por tres fases y menos del 5% por prensas. En la Figura 4 se resumen los procedimientos de extracción del aceite de oliva según la tecnología empleada.

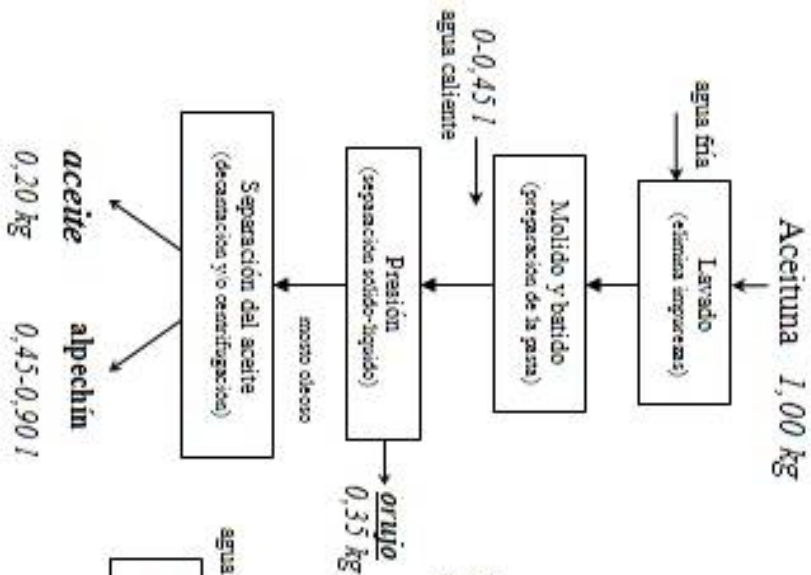
1.8.2. Gestión y aprovechamiento del alperujo.

Este orujo húmedo de dos fases se emplea mayoritariamente para obtener aceite mediante una segunda centrifugación y, después de su secado, para la extracción con disolventes orgánicos del denominado aceite de orujo. Sin embargo, el principal inconveniente del *alperujo* para su agotamiento en las orujeras, respecto a los otros orujos, es su elevada humedad y la abundancia de sólidos finos y compuestos que contiene, tales como azúcares, ácidos orgánicos y polialcoholes, que le otorgan una excesiva fluidez. Esto se traduce en problemas para su almacenamiento, transporte y secado, de modo que el almacenamiento tradicional del orujo en superficies abiertas ha tenido que sustituirse por el vertido en balsas, mientras que para su transporte interno las cintas transportadoras se han sustituido por tornillos sinfines cerrados o cintas de cangilones y, para el externo, se deben utilizar camiones con cajas selladas o tipo cuba (Hermoso y col., 1993).

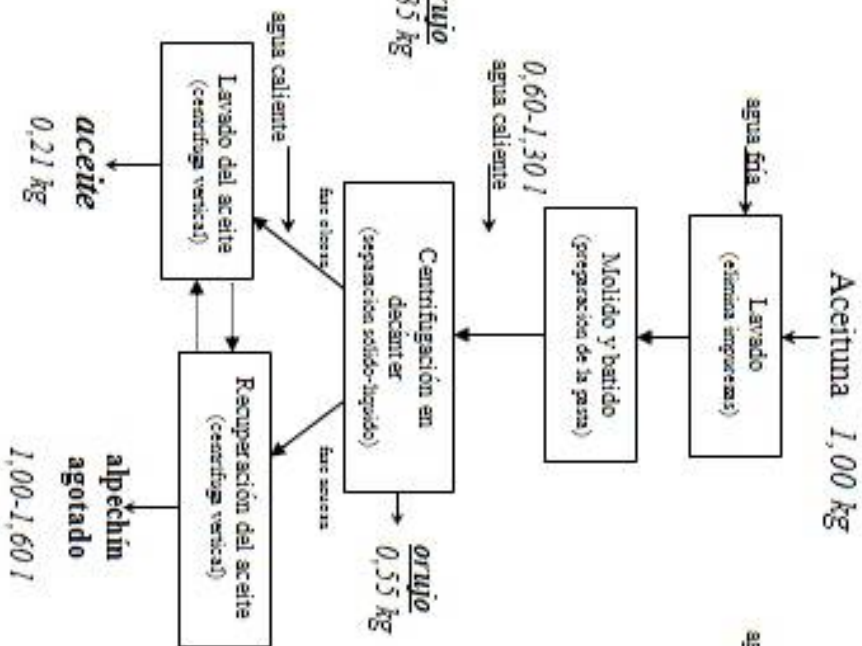
Por otra parte, las especiales características del *alperujo* repercuten también negativamente en el proceso de extracción química del aceite que contiene, ya que para conseguir el máximo rendimiento debe secarse hasta valores próximos al 8%. La presencia fundamentalmente de azúcares, que en el sistema de tres fases se quedaban en el *alpechín*, determina que éstos se caramelicen en los secaderos como consecuencia de las altas temperaturas, apelmazando la masa de *alperujo* y formando bolas que se secan sólo superficialmente, lo que incide negativamente en el proceso de reducción de la humedad. Además, los componentes orgánicos solidificados en el *alperujo* seco crean películas envolventes que impiden o dificultan el paso del disolvente, originando problemas de percolación que redundan en peores agotamientos. Por otra parte, durante el proceso de evaporación en los extractores, el vapor abre vías selectivas donde se acumulan bolsas de hexano sin evaporar, con el consiguiente riesgo de explosión al descargar el extractor.

Sistemas de centrifugación

Presión



3 fases



2 fases

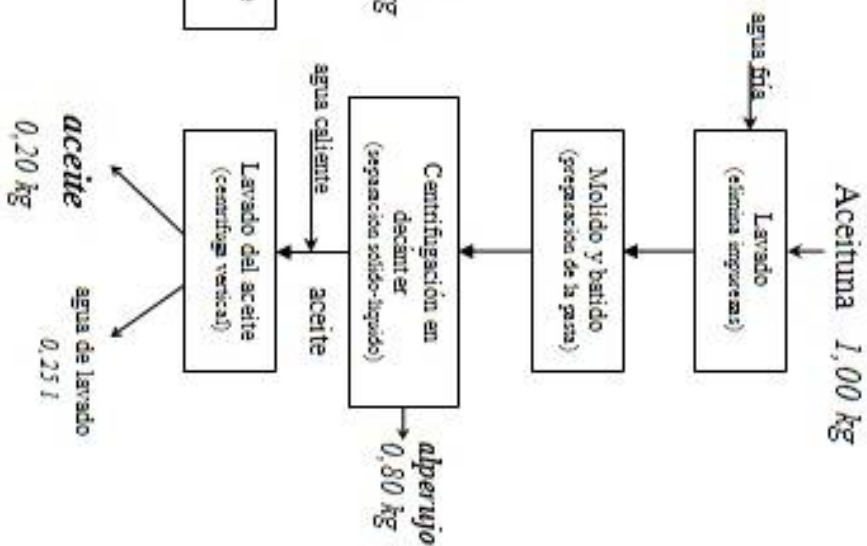


Figura 4. Esquema de los tres sistemas de extracción del aceite de oliva (Alburquerque, 2003).

Toda esta problemática ha obligado a las orujeras a realizar costosas modificaciones en sus instalaciones, para adaptarse a las características del nuevo subproducto generado por la implantación del sistema de extracción de dos fases. Además, la detección de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el aceite extraído del *alperujo* por vía química, ha obligado a un estricto refinado del mismo, lo que ha incrementado los costes de producción.

La alternativa de aprovechamiento energético de los subproductos del olivar está bien afianzada en el sector, al beneficiarse de las primas por la producción de energía eléctrica a partir de fuentes renovables. Se ha estimado que tales subproductos en Andalucía (cultivo e industria extractiva) aportan un 38% del potencial total de la biomasa generada, pudiéndose estimar su potencial energético en 1.264.260 tep/año. El aprovechamiento energético contempla la combustión directa del *orujillo* y del hueso de aceituna (se pueden quemar directamente en calderas para la obtención de energía térmica), la generación de energía eléctrica en ciclos de vapor (a partir de orujo húmedo, graso o desengrasado, orujo seco u *orujillo* que se queman para producir vapor, con el que se genera electricidad mediante turbinas), la metanización por procedimientos de digestión anaeróbica y la gasificación que utiliza orujo seco, *orujillo* o hueso. Algunas industrias del sector suelen utilizar la cogeneración en su proceso productivo, bien mediante motor alternativo o turbina de gas, generando de forma simultánea energía eléctrica y térmica y aprovechando esta última en el secado del orujo (SODEAN, 2005).

Otras vías alternativas para el aprovechamiento del *alperujo* se basan en ensayos para evaluar su empleo en alimentación animal, para aplicación directa al suelo determinando sus efectos sobre las propiedades del mismo, como enmienda orgánica en el control de la erosión y como sustrato para la producción de hongos comestibles. También se ha estudiado la viabilidad de este material como fuente de hemicelulosas mediante tratamiento alcalino para su uso como agentes espesantes, estabilizadores o emulsionantes de uso en cosméticos y en la industria farmacéutica y alimentaria (Derriche y Berrahmoune, 2007). Igualmente se ha ensayado como sustrato para la obtención de polímeros de origen microbiano y se ha sometido a procesos biológicos, como el vermicompostaje y el compostaje (Madejón y col., 1998; Filippi y col., 2002; Cayuela y col., 2006; Baeta Hall y col., 2005; Albuquerque y col., 2006a; Cegarra y col. 2006). En particular, el compostaje está especialmente indicado para

zonas geográficas mal comunicadas, con elevados costes de transporte del *alperujo* hasta las extractoras, y todavía es más interesante para elaborar abonos orgánicos, utilizables en las propias explotaciones de olivo ecológico, ya que éstas soportan los elevados costes derivados de la utilización de abonos producidos a partir de materias primas "limpias" procedentes de explotaciones ecológicas agrícolas y ganaderas. Esta forma de aprovechamientos del *alperujo* se ha extendido notablemente en Andalucía durante los últimos años, siendo cada vez más frecuente que las propias almazaras que procesan la aceituna de cultivo ecológico, sometan el *alperujo* a técnicas de compostaje crecientemente perfeccionadas, a fin de transformarlo en abonos orgánicos de calidad para su propio autoconsumo. Además, González, (2005) estudió las características húmicas de los composts de *alperujo*, de evidente interés por tratarse de materiales con un alto contenido en materia orgánica y también, ensayos recientes (Caravaca y col., 2006; Kohler y col. 2007) han demostrado la utilidad del uso de extractos solubles de composts de *alperujo* en el cultivo de leguminosas de alto interés tanto forrajero como forestal.

2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

La aplicación al suelo de la materia orgánica de los residuos, estabilizada e higienizada mediante compostaje, es el uso más adecuado para éstos ya que confiere al mismo una mejora en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, enriqueciéndolo en compuestos similares a las sustancias húmicas y aumentando la disponibilidad de nutrientes. Su uso puede hacerse en forma sólida o líquida, siendo esta última de alto interés económico como demuestran los cada vez más numerosos preparados líquidos extraídos de composts y estiércoles que se encuentran en el amplio mercado de los agroquímicos comerciales. Los composts de *alperujo* (AL), debido a su notable grado de humificación y alto contenido en materia orgánica, constituyen una materia prima de gran interés para la obtención de extractos líquidos potencialmente utilizables en agricultura mediante técnicas de fertirrigación.

El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar la materia orgánica soluble (MOS) de un compost maduro de AL obtenida bajo distintas condiciones de extracción, estudiando su rendimiento extractivo de acuerdo con el siguiente plan de trabajo:

- Caracterización agroquímica del compost de AL.
- Extracción de la MOS con NaOH 0,1 y 1M, variando la relación entre el peso de sustrato y el volumen de extractante (relación de extracción o P/V), la duración del proceso y la temperatura del mismo durante periodos de tiempo crecientes a lo largo de de 24 horas.
- Fraccionamiento de la MOS en ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y fracción no humificada (NH).
- Cuantificación del carbono orgánico de la MOS y del de polifenoles y carbohidratos contenidos en la misma, así como en cada una de sus fracciones.

Un esquema del trabajo de investigación se presenta en la Figura 5.

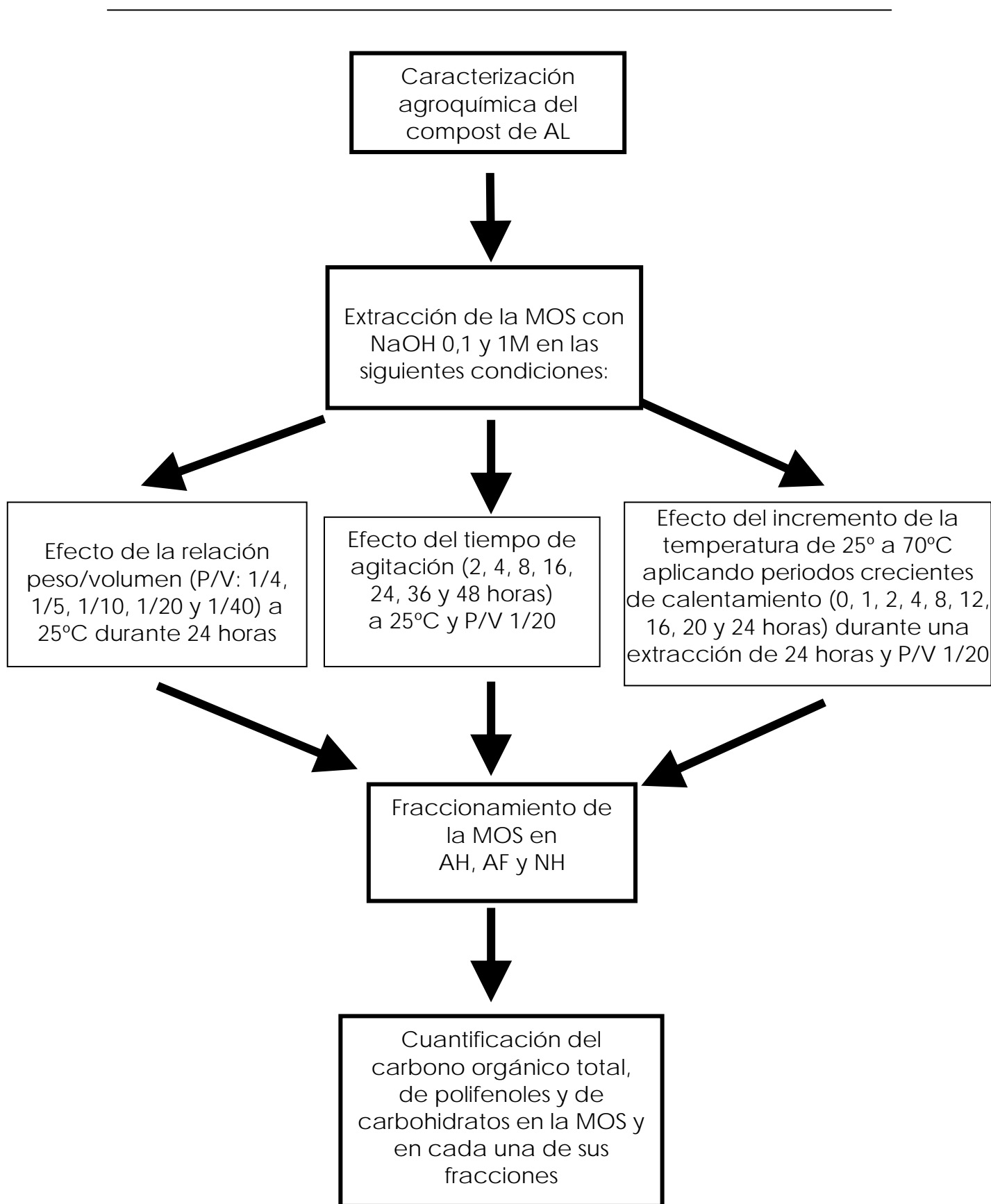


Figura 5. Esquema general del plan de trabajo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Obtención del compost de AL y características del mismo.

El compost de AL se obtuvo en la planta-piloto de compostaje que el CEBAS-CSIC posee en su finca experimental de La Matanza, Santomera (Murcia). El AL se mezcló con cama fresca de vaca (CFV), como agente estructurante, preparándose una pila de 4.000 kg de forma trapezoidal de anchura 2,5 m y altura aproximada 1,5 m. Además, se incorporó como inoculante un 1% de otro compost maduro de AL (CM) procedente de anteriores experiencias, utilizándose las siguientes proporciones:

90% AL + 9% CFV + 1% CM (sobre peso húmedo)
(87/11/2, sobre peso seco)

El compostaje se efectuó durante 26 semanas, mediante combinación de volteos mecánicos y ventilación forzada con control automatizado de la temperatura, lo que se conseguía activando un ventilador de forma continua para insuflar aire en la pila, si se alcanzaban valores superiores a 55°C (Cegarra y col., 2006). A temperaturas inferiores, la ventilación se suministraba periódicamente de forma programada (control "feed-back" de la temperatura propio del sistema Rutgers de compostaje, Finstein y col., 1985).

El pH del compost maduro obtenido (Tabla 1a) fue ligeramente superior al intervalo considerado compatible por Zucconi y de Bertoldi (1987) con el crecimiento de las plantas, (5,50-8,00) y se situó dentro del intervalo normal de variación de los estiércoles (Navarro, 1990) y de los composts obtenidos de la fracción orgánica de RSU (Paulet, 2000), mientras que la CE fue inferior en el caso del compost de AL. También mostró un elevado contenido de MO, gran parte de ella de naturaleza línica, determinando esto último un valor de la relación C_{OT}/N_T claramente superior a 12, valor sugerido por Bernal y col. (1998) como representativo de materiales suficientemente maduros.

El contenido de K fue elevado (4,25%), generalmente mayor que muchos estiércoles y otros composts preparados a partir de la fracción orgánica de RSU, mientras que casi siempre fueron menores los de N, P, Ca, Mg y micronutrientes. El compost de AL mostró un nivel bajo de $N-NO_3^-$ y $N-NH_4^+$, siendo este último inferior al 0,04%, límite establecido por Zucconi y de Bertoldi (1987) y Bernal y col. (1998) para composts de diversa procedencia. También mostró un contenido reducido de metales

pesados pero, en cambio, fue alta su capacidad de cambio catiónico (CCC) superior al mínimo estimado en composts de RSU y lodos de depuradora (60 y 67 meq/100g de MO, según Harada e Inoko, (1980) e Iglesias Jiménez y Pérez García, (1992), respectivamente).

Tabla 1a. Características del compost de AL.

<i>Parámetro¹</i>	<i>Compost de AL</i>
pH ²	8,67
CE ² (dS/m)	4,81
MO (%)	79,29
Lignina (%)	38,72
Celulosa (%)	15,7
Hemicelulosa (%)	26,0
C _{OT} (%)	43,48
N _T (%)	2,62
C _{OT} /N _T	16,60
N-NH ₄ ⁺ (mg/kg)	119
N-NO ₃ ⁻ (mg/kg)	31
CCC (meq/100g MO)	110,01
P (%)	0,19
K (%)	4,25
Ca (%)	2,97
Mg (%)	0,57
Na (%)	0,41
Fe (mg/kg)	1.468
Cu (mg/kg)	36
Mn (mg/kg)	98
Zn (mg/kg)	138
Pb (mg/kg)	20
Cr (mg/kg)	12
Ni (mg/kg)	10
Cd (mg/kg)	nd

¹Datos expresados sobre materia seca, ²extracto acuoso 1:10, nd: no detectable, CE (conductividad eléctrica), MO (materia orgánica), C_{OT} (carbono orgánico total), N_T (nitrógeno total) y CCC (capacidad de cambio catiónico).

Así mismo, fue bajo el contenido graso, de polifenoles y carbohidratos hidrosolubles (Tabla 1b), mostrando un valor de IG próximo al 80%, claramente superior al mínimo sugerido por Bernal y col. (1998) para considerar un material orgánico

suficientemente maduro y, por tanto, potencialmente utilizable como enmendante y/o fertilizante del suelo, sin riesgo de inducir fitotoxicidad alguna.

Tabla 1b. Características del compost de AL.

<i>Parámetro¹</i>	<i>Compost de AL</i>
Contenido graso (%)	0,44
Polifenoles hidrosolubles (%)	0,29
Carbohidratos hidrosolubles (%)	0,81
IG (%)	78
RH (%)	20,4
IH (%)	14,7
P _{AH} (%)	72,3
C _{OH} (%)	2,70
C _{OH} /N _{OT}	1,03

¹Datos expresados sobre materia seca, IG (índice de germinación), RH: $(C_{EX}/C_{OT}) \times 100$, IH: $(C_{AH}/C_{OT}) \times 100$, P_{AH}: $(C_{AH}/C_{EX}) \times 100$, C_{OH} (carbono orgánico hidrosoluble) y N_{OT} (nitrógeno orgánico total).

El compost mostró igualmente valores adecuados de sus parámetros de humificación, con un índice de humificación (IH) de 14,7% y un porcentaje de ácidos húmicos (P_{AH}) de 72,3%. Iglesias Jiménez y Pérez García (1992) consideraron valores mínimos aceptables 13% y 62%, respectivamente, para estos parámetros en composts preparados a partir de RSU.

Por último, la relación C_{OH} /N_{OT} fue claramente superior al valor máximo (0,55) referido por Bernal y col. (1998) y al estimado (0,70) por Hue y Liu (1995) en composts de distinto origen suficientemente maduros, mientras que el contenido en carbono orgánico hidrosoluble (C_{OH}) fue también superior al de otros materiales orgánicos maduros: 0,5% (García y col., 1992a), 1% (Hue y Liu, 1995) y 1,7% (Bernal y col., 1998).

3.2 Extracción, fraccionamiento y análisis de la MOS.

El rendimiento de MOS y algunas de sus características químicas, resultan generalmente afectadas por factores tales como la concentración del agente

extractante, la relación sólido/líquido utilizada en el proceso de extracción, la duración de este y el calor aplicado durante el transcurso del mismo.

Se estudió la influencia de estos factores para el caso del compost de AL anteriormente descrito, utilizándose alternativamente NaOH 0,1 y 1M tal y como se detalla a continuación:

- Se evaluó la efectividad de variar la relación de extracción P/V (1/4, 1/5, 1/10, 1/20 y 1/40) durante el proceso extractivo (24 horas a 25°C).
- Se ensayaron diferentes tiempos de extracción (2, 4, 8, 16, 24, 36 y 48 horas), trabajando con relación P/V 1/20 a 25°C.
- Se varió la temperatura de 25° a 70°C aplicando tiempos crecientes de calentamiento (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas) durante una extracción de 24 horas a P/V 1/20.

La MOS obtenida en las condiciones descritas se fraccionó como se indica en la Figura 6. Primeramente se efectuó la precipitación de los AH con H₂SO₄ concentrado, acidificando hasta pH 2, y separándolos después de 24 horas de reposo a 4°C, de la fracción fúlvica (FF) mediante centrifugación. Esta última fracción se eluyó por una columna de gel de PVP, reteniéndose los AF y obteniéndose la fracción NH.

El contenido de carbono orgánico en la MOS y sus distintas fracciones se determinó mediante un analizador automático TOC-SKALAR para líquidos, expresándose los resultados como el porcentaje de carbono orgánico soluble respecto al carbono orgánico total de la muestra seca de compost (%C_{SOL}/C_{OT} m.s.).

Igualmente, se determinó el contenido de polifenoles y carbohidratos como ácido cafeico y glucosa respectivamente, expresando los resultados como carbono de estos compuestos respecto al carbono orgánico total de la muestra seca (%C_{CAF}/C_{OT} m.s. y %C_{GLUC}/C_{OT} m.s.).

Éstas y otras técnicas analíticas utilizadas para la caracterización del compost de AL y la MOS, se detallan en el capítulo 6.

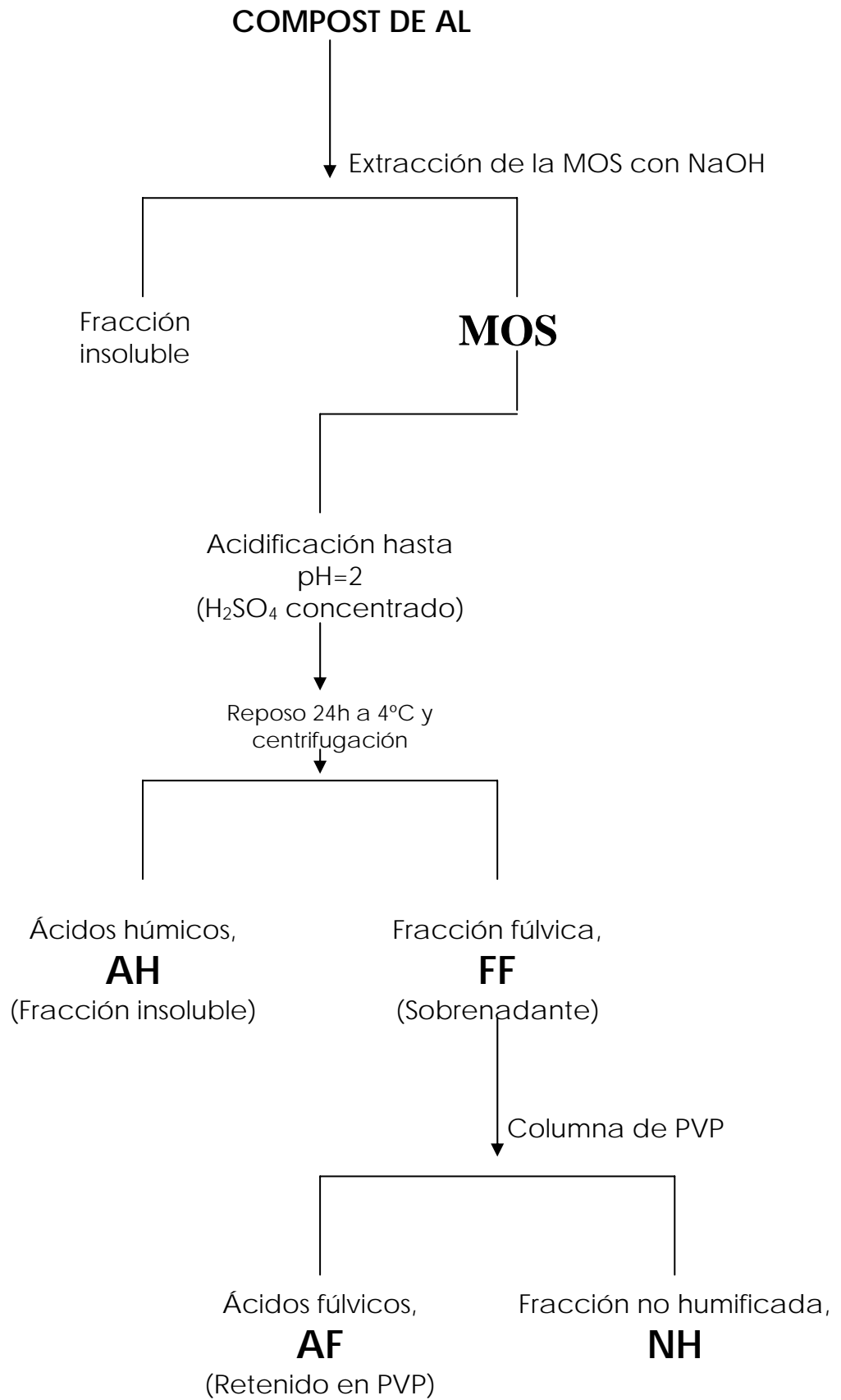


Figura 6. Extracción y fraccionamiento de la MOS obtenida a partir del compost de AL.

Los resultados obtenidos se presentan como valores medios de los replicados correspondientes en cada caso. El análisis estadístico (estadísticos generales, análisis de la varianza y diferencias entre las medias realizadas por el test de la mínima diferencia significativa "LSD") se ha realizado mediante el paquete SPSS versión 11.5 para Windows.

Los resultados y su discusión se muestran en el siguiente capítulo.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

4.1. Influencia de la relación de extracción P/V sobre la solubilidad de la materia orgánica del compost a tiempo y temperatura constantes.

4.1.1. Efecto sobre el rendimiento de MOS.

El rendimiento de MOS obtenido con NaOH 0,1M se incrementó moderadamente conforme disminuyó el valor de la relación P/V (incremento de la proporción de disolvente), registrándose un valor máximo (24,97%) a P/V 1/40 (Figura 7 y Tabla 2). Con NaOH 1 M la tendencia fue similar, siendo el rendimiento total de MOS aproximadamente el doble del obtenido con NaOH 0,1M para todos los valores de P/V. Estos datos muestran similitud con los obtenidos por Roletto y Ottino (1984) a partir de dos composts de residuos lignocelulósicos, usando como extractante NaOH 0,5M y valores de P/V 1/10 y 1/100.

La componente mayoritaria de la MOS fue la fracción AH tanto cuando se utilizó el NaOH 0,1M como 1M (valores medios aproximados de 15 y 33%, respectivamente), mientras que los AF representaron poco más del 2% del rendimiento extractivo conseguido con ambas concentraciones de extractante, y la fracción NH, 5% cuando se utilizó NaOH 0,1 M, y 8% con 1M respectivamente.

Cuando la extracción se efectuó con NaOH 0,1M, el índice de polimerización (IP = AH/AF), que relaciona el contenido de carbono orgánico de estas dos fracciones de la MOS, mostró un claro incremento en el intervalo de P/V comprendido entre 1/4 y 1/10 (Figura 8), permaneciendo prácticamente constante, alrededor de 10, para los demás valores de P/V. Este incremento sugiere la disolución preferente de los componentes de mayor volumen molecular propios de los AH al disminuir los valores de P/V, cuando se utilizó el extractante más diluido. Cuando se utilizó el extractante más concentrado, el valor de IP fue siempre mayor y se mantuvo próximo a 13 en el citado intervalo de P/V, disminuyendo ligeramente para los valores más bajos de la relación (1/20 y 1/40). El superior potencial extractante del NaOH concentrado se manifiesta, según estos datos, ya con bajas proporciones de disolvente, al contrario de lo que ocurrió con NaOH 0,1M. La tendencia de IP al disminuir con las relaciones de extracción 1/20 y 1/40 (mayor proporción de extractante), sugiere una cierta degradación de los AH hacia moléculas de menor volumen, cuantificadas en la fracción AF.

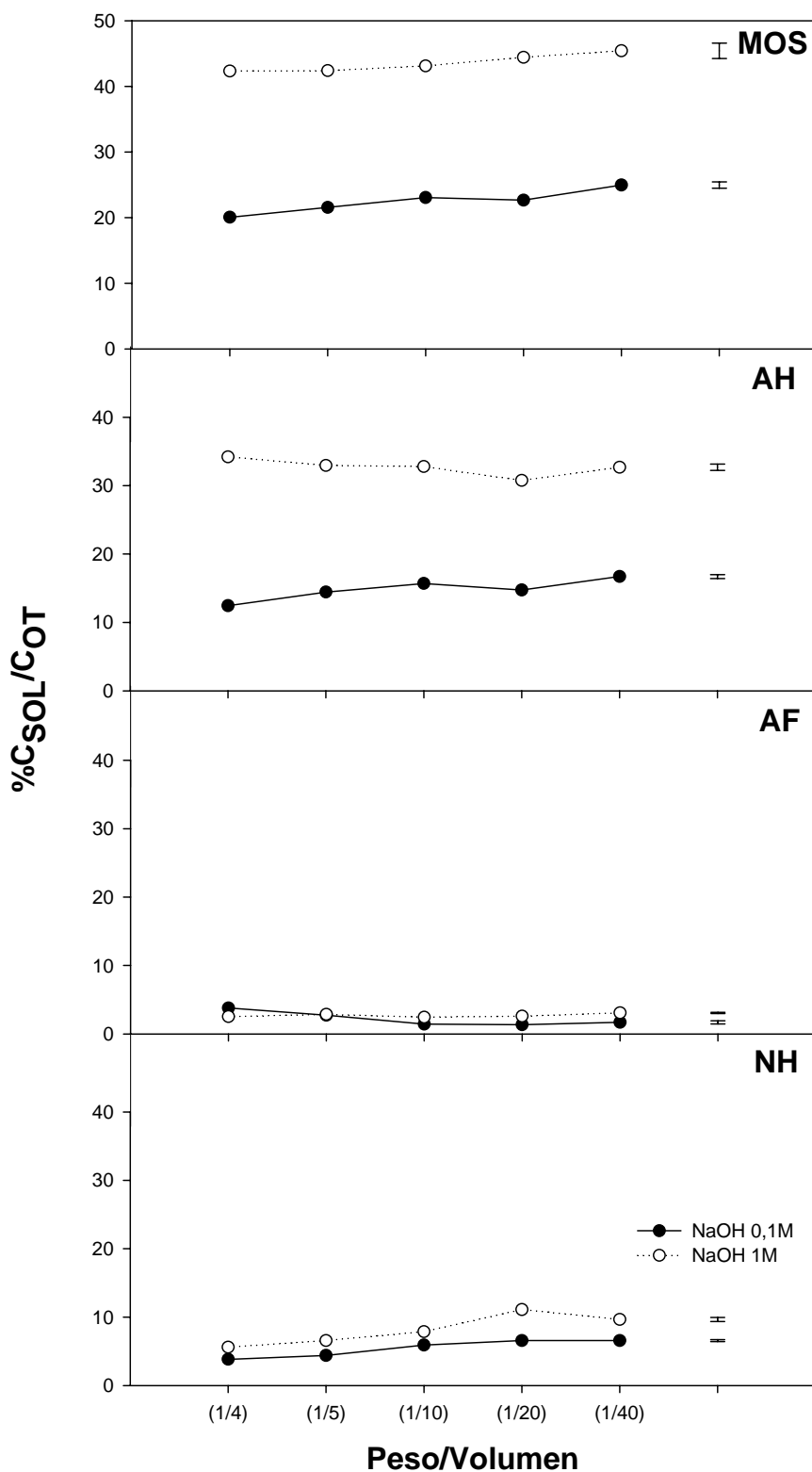


Figura 7. Influencia de la relación P/V sobre el rendimiento extractivo de la MOS y de sus fracciones AH, AF y NH (%C_{SOL}/C_{OT} m.s.), a tiempo y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa (P > 0,05).

Tabla 2. Influencia de la relación P/V sobre el rendimiento de MOS y de sus fracciones AH, AF y NH (%C_{SOL}/C_{OT} m.s.), a tiempo y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes.

	MOS	AH	AF	NH
NaOH 0,1 M				
P/V				
1/4	20,06 d	12,45 d	3,79a	3,82 d
1/5	21,55 c	14,43 c	2,73 b	4,39 c
1/10	23,06 bc	15,70 b	1,43 d	5,93 b
1/20	22,67 b	14,74 c	1,36 c	6,57 a
1/40	24,97 a	16,70 a	1,69 c	6,57 a
P	***	***	***	***
NaOH 1 M				
P/V				
1/4	42,32 b	34,14 a	2,53 b	5,59 e
1/5	42,38 b	32,95 bc	2,86 b	6,57 d
1/10	43,10 ab	32,77 bc	2,45 d	7,88 c
1/20	44,43 ab	30,74 c	2,58 c	11,11a
1/40	45,41 a	32,68 b	3,07 a	9,66 b
P	*	**	***	***
Interacción	NS	NS	NS	NS

***, **, * y NS: P < 0.001, 0.01 y 0.05 y no significativo, respectivamente. Para cada factor, valores en la misma columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Duncan a P < 0.05.

La evolución de la relación AF/NH (Figura 9), siempre indicó un claro predominio cuantitativo de la fracción NH sobre la AF, sobre todo a P/V 1/10, 1/20 y 1/40. Al utilizar las relaciones 1/4 y 1/5, tal predominio fue menor, especialmente con NaOH 0,1 M, lo que sugiere una menor capacidad que el NaOH 1M para co-solubilizar compuestos de bajo volumen molecular, no estrictamente humificados, con los AF, probablemente debido a la menor agresividad química del extractante cuando se utiliza menos concentrado.

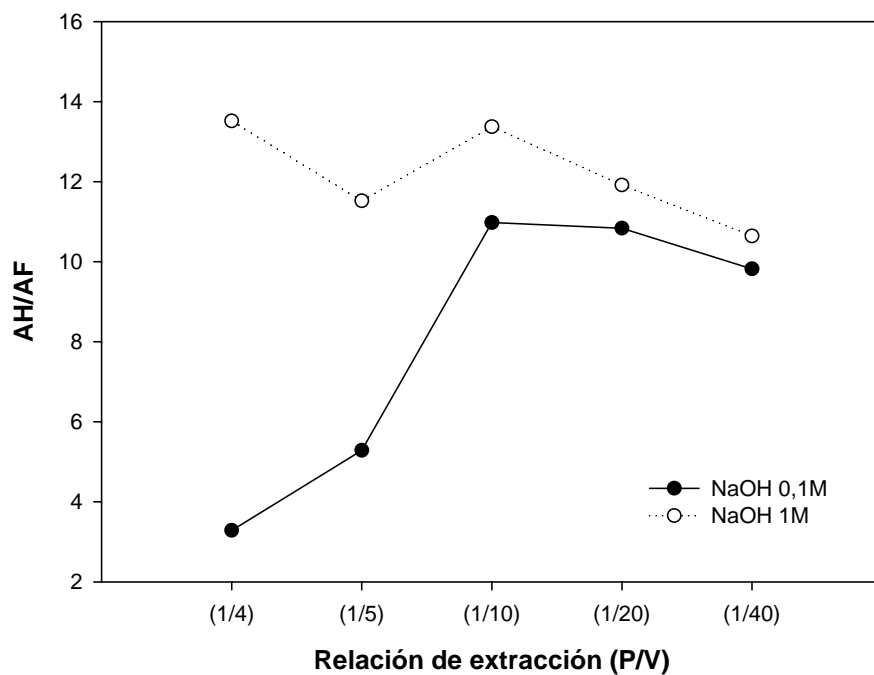


Figura 8. Variación del índice de polimerización ($IP = AH/AF$) con la relación de extracción usando NaOH 0,1 y 1M como extractantes.

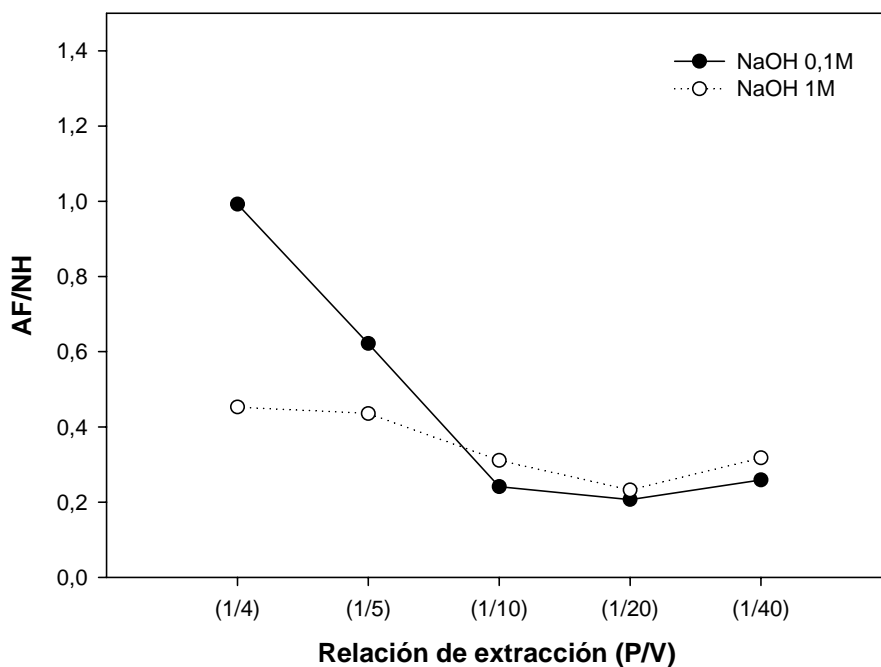


Figura 9. Variación de la relación AF/NH con la relación de extracción usando NaOH 0,1 y 1M como extractantes.

4.1.2. Efecto sobre el contenido de polifenoles.

El contenido de polifenoles de la MOS se incrementó conforme disminuyó el valor de P/V, obteniéndose máximos de 2,26% con NaOH 0,1M y 3,09% con la concentración 1M a P/V 1/40 (Figura 10). Así mismo, la utilización del extractante más concentrado indujo una mayor solubilidad de los compuestos fenólicos en todos los casos, lo que fue más evidente a P/V 1/4 y 1/5.

La fracción AH evolucionó de forma similar a la MOS, con ambas concentraciones de extractante, mostrando siempre la mayor concentración de componentes fenólicos entre las tres fracciones analizadas, mientras que en los AF, tal concentración fue netamente menor (valor máximo 0,41%) y todavía fue más baja en la fracción NH. El contenido fenólico de las dos últimas fracciones apenas se incrementó a medida que disminuyó el valor de P/V con cualquiera de las dos concentraciones ensayadas.

Cuando se utilizó NaOH 0,1M, el porcentaje de carbono fenólico respecto al carbono constitutivo de la MOS, se incrementó con la proporción del extractante empleado, obteniéndose los valores porcentuales más altos con los valores de P/V 1/20 y 1/40 (más de 9% del carbono del extracto en forma fenólica, Tabla 3). Al fraccionar la MOS, se encontró mayor concentración de fenoles en los AF que en los AH (más del 20 % del carbono en forma fenólica), al utilizar elevadas proporciones de extractante, mientras que fue irrelevante la presencia de estos compuestos en la fracción NH. También el incremento de la proporción del extractante ocasionó claros incrementos de los valores porcentuales en AH y AF, mientras que tal aumento fue casi inapreciable en NH. Cuando la extracción se efectuó con NaOH 1M, las tendencias anteriores estuvieron mucho menos definidas, siendo generalmente más bajos los citados valores porcentuales, especialmente al utilizar las relaciones 1/10, 1/20 y 1/40. La excepción fue NH, donde los valores fueron mayores que con NaOH 0,1M.

El aumento observado en la MOS puede deberse a una degradación parcial de biopolímeros asociados a los AH, como la lignina, que constituye el 38,72% del compost usado en esta experiencia (Tabla 1a). Este biopolímero se acepta que es uno de los principales precursores en la formación de las sustancias húmicas (Flaig, 1988). También, es degradado por agentes alcalinos (Billa y col., 1998; Xiao y col., 2001; Huang y col., 2007) y, en el caso del AL, se sabe que es parcialmente degradado durante su compostaje (Cegarra y col., 2006).

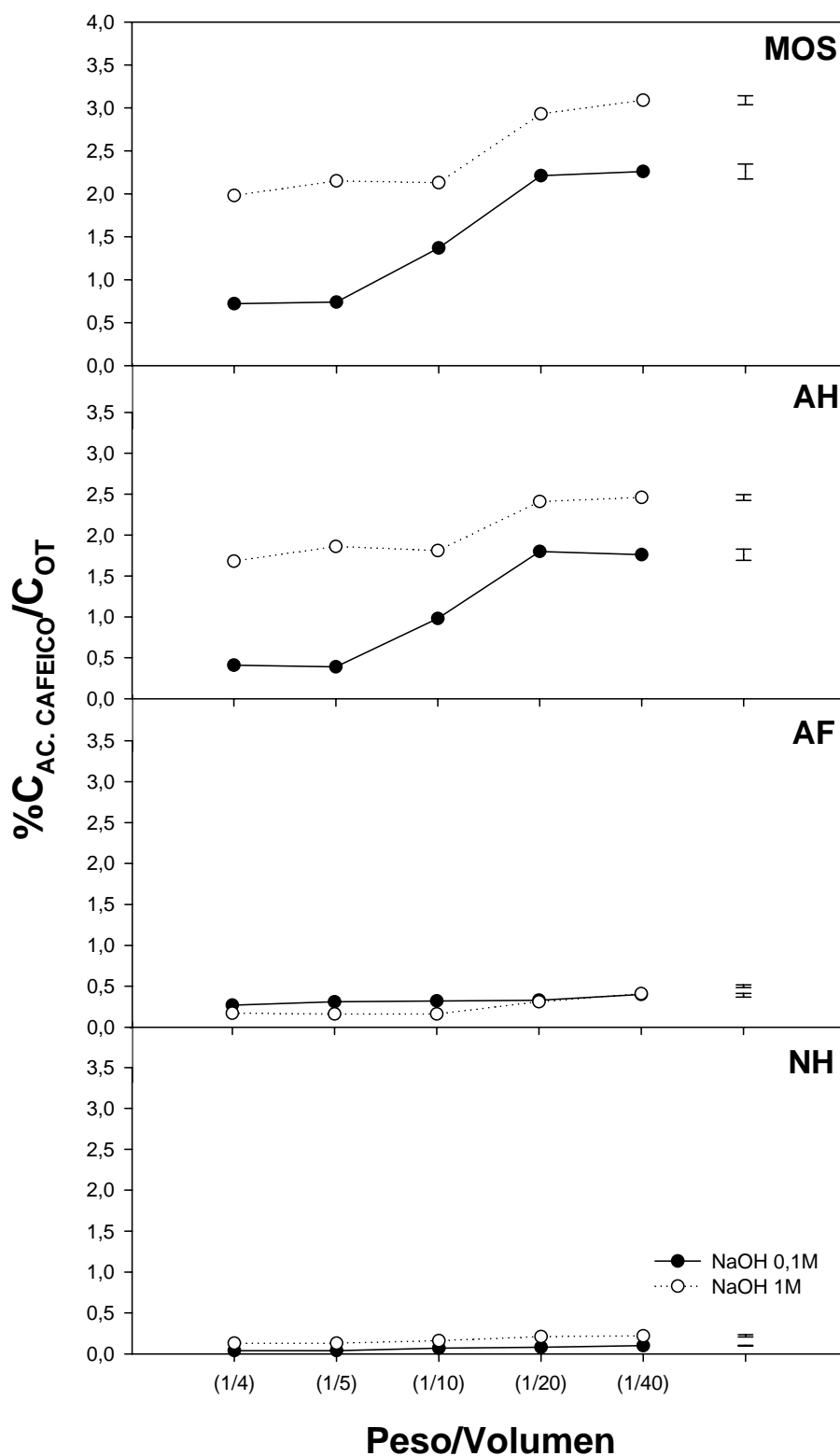


Figura 10. Influencia de la relación P/V sobre el contenido de polifenoles en la MOS y en sus fracciones AH, AF y NH (% $C_{AC.CAFEICO}/C_{OT}$ m.s.), a tiempo y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa ($P > 0,05$).

Tabla 3. Porcentaje de carbono de polifenoles respecto al carbono total solubilizado en la MOS y en sus fracciones, según la relación de extracción.

NaOH 0,1M			NaOH 1M		
	Relación P/V	Polifenoles (%)		Relación P/V	Polifenoles (%)
MOS	(1/4)	3,59	MOS	(1/4)	4,68
	(1/5)	3,43		(1/5)	5,07
	(1/10)	5,94		(1/10)	4,94
	(1/20)	9,75		(1/20)	6,59
	(1/40)	9,05		(1/40)	6,80
AH	(1/4)	3,29	AH	(1/4)	4,91
	(1/5)	2,70		(1/5)	5,64
	(1/10)	6,24		(1/10)	5,52
	(1/20)	12,21		(1/20)	7,84
	(1/40)	10,54		(1/40)	7,53
AF	(1/4)	7,12	AF	(1/4)	6,72
	(1/5)	11,36		(1/5)	5,59
	(1/10)	22,38		(1/10)	6,53
	(1/20)	24,26		(1/20)	12,02
	(1/40)	23,53		(1/40)	13,36
NH	(1/4)	1,05	NH	(1/4)	2,33
	(1/5)	0,91		(1/5)	1,98
	(1/10)	1,18		(1/10)	2,03
	(1/20)	1,22		(1/20)	1,89
	(1/40)	1,52		(1/40)	2,28

4.1.3. Efecto sobre el contenido de carbohidratos.

También al disminuir la relación P/V, el contenido total de carbohidratos en la MOS mostró un incremento similar al experimentado por los polifenoles, obteniéndose los valores máximos (3,90 y 7,37%) a P/V 1/40 para NaOH 0,1M y 1M respectivamente (Figura 11). Con la concentración 1M, se consiguió solubilizar tres veces más carbohidratos que con la concentración 0,1M a valores de P/V 1/4 y 1/5, creciendo la diferencia conforme disminuía la relación P/V. El aumento de concentración alcalina e, igualmente, la disminución de P/V se tradujeron en incrementos de carbohidratos en las fracciones AH y NH más o menos parecidos a los observados en la MOS, pero fue en los AH donde esto se apreció de modo más evidente.

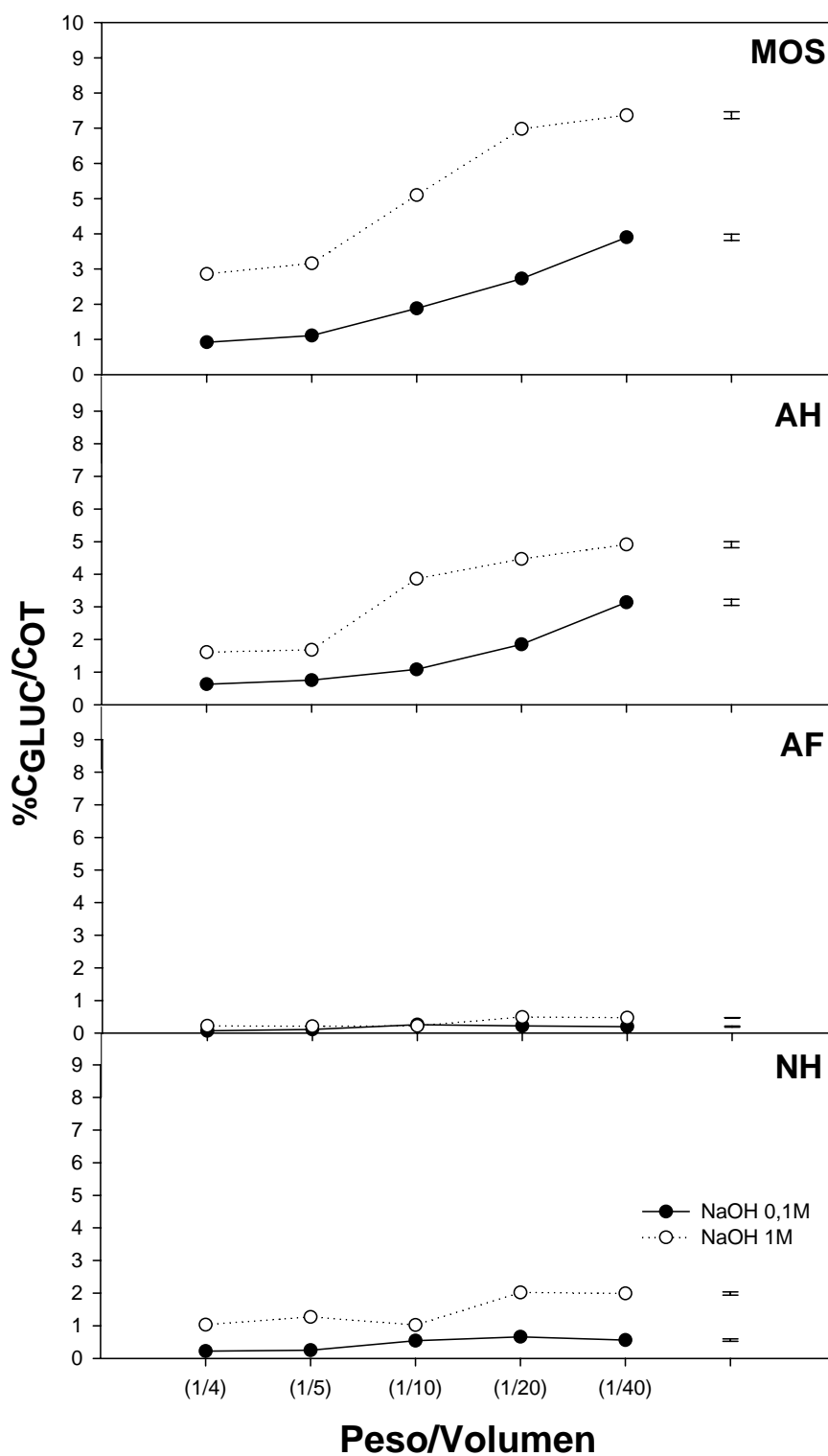


Figura 11. Influencia de la relación P/V sobre el contenido de carbohidratos en la MOS y en sus fracciones AH, AF y NH (%C_{GLUC}/C_{OT} m.s.), a tiempo y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa (P > 0,05).

El porcentaje de carbono de los carbohidratos, respecto al carbono total de la MOS, creció al incrementarse la proporción de extractante respecto a peso de compost y fue notablemente mayor con NaOH 1M que con NaOH 0,1M, alcanzándose sin embargo, valores muy similares entre si y próximos a 16 %, con ambas concentraciones de extractante, con la relación 1/40 (Tabla 4). Cuando se realizó un cálculo análogo sobre las tres fracciones de la MOS, los valores obtenidos mostraron una distribución demasiado aleatoria para poder definir tendencias concretas en cada una de ellas o comparar valores entre las dos concentraciones de extractante utilizadas.

Tabla 4. Porcentaje de carbono de carbohidratos respecto al carbono total solubilizado en la MOS y en sus fracciones según la relación de extracción.

NaOH 0,1M			NaOH 1M		
	Relación P/V	Carbohidratos (%)		Relación P/V	Carbohidratos (%)
MOS	(1/4)	4,59	MOS	(1/4)	6,76
	(1/5)	5,15		(1/5)	7,46
	(1/10)	8,15		(1/10)	11,83
	(1/20)	12,04		(1/20)	15,71
	(1/40)	15,62		(1/40)	16,23
AH	(1/4)	5,06	AH	(1/4)	4,71
	(1/5)	5,20		(1/5)	5,10
	(1/10)	6,88		(1/10)	11,78
	(1/20)	12,55		(1/20)	14,54
	(1/40)	18,80		(1/40)	15,02
AF	(1/4)	1,85	AF	(1/4)	8,70
	(1/5)	4,03		(1/5)	7,34
	(1/10)	18,18		(1/10)	8,98
	(1/20)	16,18		(1/20)	18,99
	(1/40)	11,76		(1/40)	15,31
NH	(1/4)	5,76	NH	(1/4)	18,43
	(1/5)	5,69		(1/5)	19,33
	(1/10)	9,11		(1/10)	12,94
	(1/20)	10,05		(1/20)	18,18
	(1/40)	8,52		(1/40)	20,60

Es sabido que el tratamiento alcalino es un método usado para la degradación de biopolímeros tales como celulosas y hemicelulosas, presentes tanto en restos vegetales como en residuos agrícolas (Sjöström, 1991) y, también, se sabe que el compost de AL posee un elevado contenido de estos biopolímeros (Albuquerque, 2003), lo que permite suponer una cierta descomposición de los mismos durante la

extracción alcalina de la MOS, generándose así carbohidratos más sencillos, cuantificables como glucosa.

De los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la relación de extracción sobre la obtención de MOS con NaOH 0,1 y 1M, puede concluirse lo siguiente:

Tal relación afectó al rendimiento extractivo de MOS, incrementándolo al disminuir el valor de P/V para las dos concentraciones ensayadas de extractante. El rendimiento con NaOH 1M fue aproximadamente el doble que con NaOH 0,1M. Con ambas concentraciones, los AH constituyeron la componente mayoritaria de la MOS, mientras que la fracción NH y, especialmente los AF, mostraron rendimientos notablemente más bajos que los AH. La evolución del índice de polimerización AH/AF mostró el potencial superior de extracción del extractante concentrado a cualquier valor de la relación P/V, para solubilizar los AH o fracción más polimerizada de la materia orgánica, si bien se apreció cierto decrecimiento de tal índice cuando se utilizaron mayores proporciones de extractante, sugiriendo una despolimerización de los AH que aumentaría la proporción de AF.

El contenido de compuestos fenólicos de la MOS aumentó al disminuir P/V, con ambas concentraciones de extractante, si bien la mayor concentración de NaOH indujo una mayor solubilidad de estos compuestos. En ambos casos, el mayor contenido de fenoles se encontró en los AH, que evolucionó de forma parecida al contenido fenólico de la MOS, mientras que la presencia de estos compuestos fue casi irrelevante en AF y NH. La proporción de carbono fenólico respecto al carbono de la MOS fue del orden del 9% con los valores de P/V más bajos, llegando hasta el 20% en los AF, 10-12% en los AH y poco más del 1% en la fracción NH, cuando la extracción se efectuó con NaOH 0,1M. Estos porcentajes fueron generalmente más bajos cuando se utilizó NaOH 1M como extractante.

El comportamiento de los carbohidratos mostró cierto parecido con los polifenoles, aumentando su contenido al disminuir P/V para ambas concentraciones de NaOH. También, la fracción con mayor contenido de estos compuestos fue la de los AH, evolucionando de forma similar a la observada en la MOS.

4.2. Influencia del tiempo de extracción a P/V y temperatura constantes sobre la solubilidad de la materia orgánica del compost.

4.2.1. Efecto sobre el rendimiento de MOS.

El aumento del tiempo de extracción incrementó siempre el rendimiento de MOS tanto con NaOH 0,1M como con 1M, alcanzándose valores máximos de 30,49 y 45,28% respectivamente tras 48 horas de extracción, y un comportamiento similar se observó para la fracción AH (Tabla 5), que fue por otro lado, la componente mayoritaria de la MOS. Este incremento fue aproximadamente lineal cuando se utilizó la concentración menos alcalina, pero no con NaOH 1M, que mostró una ligera ralentización a partir de las 24 horas de agitación (Figura 12). Los AF se extrajeron prácticamente en su totalidad durante las primeras horas con ambas concentraciones de extractante, constituyendo la fracción minoritaria de la MOS.

Así mismo el índice IP (AH/AF), para las dos concentraciones ensayadas, fue siempre mayor con NaOH 1M y se incrementó con el tiempo en ambos casos (Figura 13), moderándose tal incremento a partir de las 24 horas de extracción, especialmente con NaOH 1M. Lo anterior indica que la mayor capacidad extractiva del NaOH 1M se manifiesta también en un efecto disolvente mayor de la componente molecular más polimerizada (AH), si bien la creciente supremacía de AH sobre AF (siempre $IP > 1$), se moderó claramente con tiempos de extracción superiores a 24 horas. Estos resultados sugieren un efecto oxidativo (asociado a la prolongación del tiempo de extracción) preferentemente sobre las moléculas de mayor volumen molecular propias de los AH, que resultarían parcialmente degradadas, generándose así estructuras moleculares más sencillas cuantificables en la fracción AF.

Varios autores han observado un efecto similar del tiempo de extracción en diversos materiales orgánicos. Cegarra (1978) usando NaOH 0,1M con turba, sirle y suelos enmendados con ambos materiales, solubilizó respectivamente un máximo de 8,02 y 0,83% del carbono total, para el caso de la turba y su enmienda, y del 5,24 y 0,39% para sirle y su enmienda habiendo observado, igualmente, un incremento paulatino con el tiempo de agitación. También, Roletto y Ottino (1984) en composts de residuos forestales, consiguieron solubilizar una media de 5,29% del carbono total como carbono de AH utilizando NaOH 0,5M y P/V 1/10 después de un incremento del rendimiento de extracción según varió el tiempo de agitación.

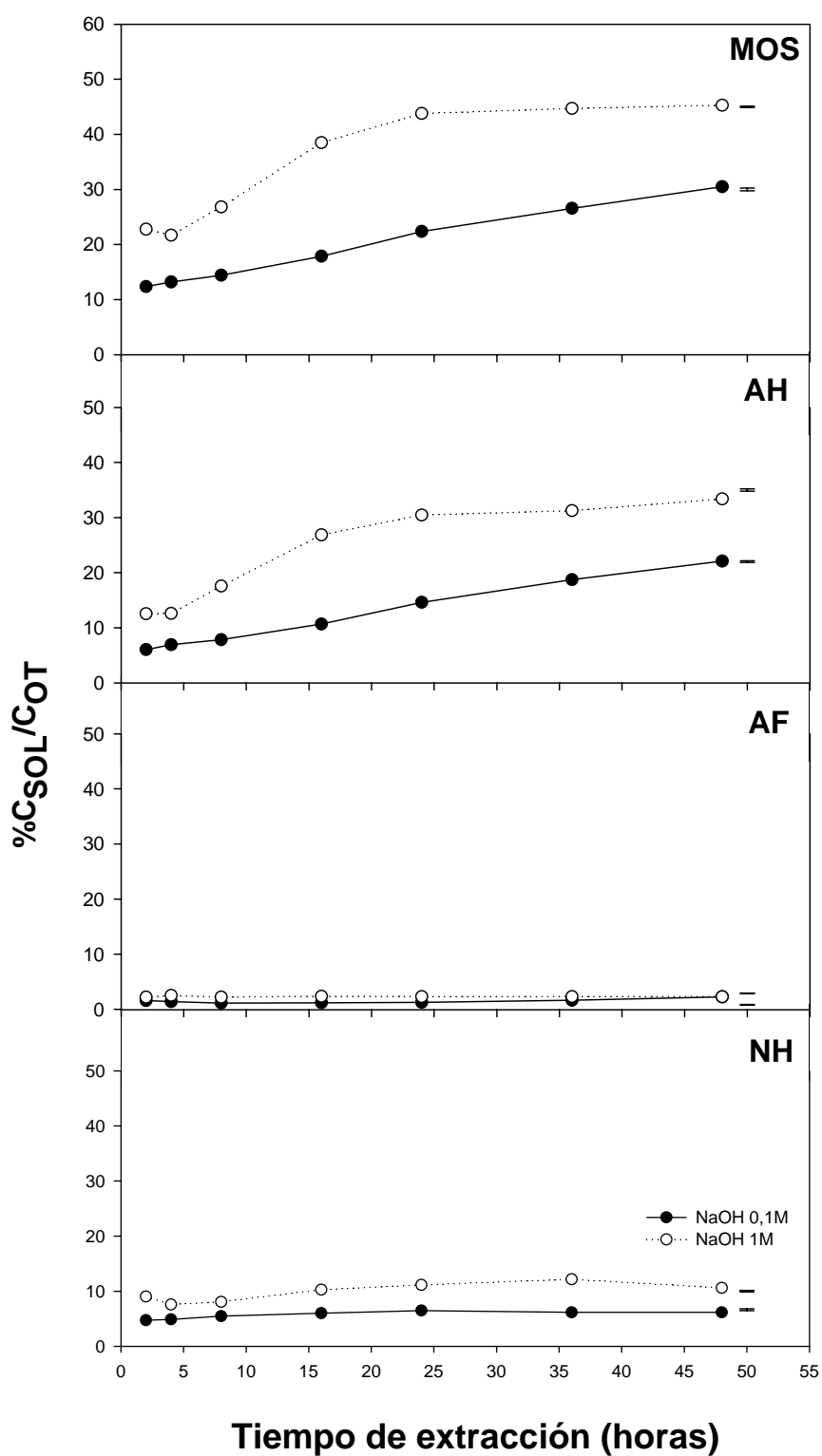


Figura 12. Influencia del tiempo de extracción sobre el rendimiento extractivo de la MOS y de sus fracciones AH, AF y NH (%C_{SOL}/C_{OT} m.s.), a P/V y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa (P > 0,05).

4. Resultados experimentales y discusión

Para el caso de compost de AL, González (2005) también observó el mismo incremento con el tiempo consiguiendo un valor máximo, próximo al 25%, para el rendimiento total de MOS extrayendo con NaOH 0,1M a P/V 1/20 durante 24 horas, apreciando además un comportamiento similar para IP al que se ha descrito en este apartado.

Tabla 5. Influencia del tiempo de extracción sobre el rendimiento de MOS y de sus fracciones AH, AF y NH (%C_{SOL}/C_{OT} m.s.), a P/V y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes.

	MOS	AH	AF	NH
NaOH 0,1 M				
Horas				
2	12,35 g	6,04 g	1,58 b	4,73 d
4	13,20 f	6,91 f	1,39 c	4,90 d
8	14,42 e	7,83 e	1,12 d	5,47 c
16	17,87 d	10,69 d	1,17 d	6,01 b
24	22,37 c	14,62 c	1,25 b	6,50 a
36	26,55 b	18,74 b	1,64 b	6,17 ab
48	30,49 a	22,10 a	2,24 a	6,15 ab
P	***	***	***	***
NaOH 1 M				
Horas				
2	22,77 f	12,56 f	2,19 e	9,02 d
4	21,68 g	12,60 f	2,51 a	7,57 f
8	26,80 e	17,55 e	2,19 d	8,06 e
16	38,49 d	26,85 d	2,36 b	10,28 c
24	43,79 c	30,45 c	2,29 c	11,13 a
36	44,69 b	31,25 b	2,29 c	12,15 a
48	45,28 a	33,39 a	2,28 c	10,61 b
P	***	***	***	***
Interacción	NS	NS	NS	NS

***, **, * y NS: P < 0.001, 0.01 y 0.05 y no significativo, respectivamente. Para cada factor, valores en la misma columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Duncan a P < 0.05.

Conforme se incrementó el tiempo de extracción, la relación AF/NH (Figura 14) no experimentó cambios relevantes, manteniéndose sus valores dentro del intervalo 0,2-0,3% con ambas concentraciones del extractante, y ello a pesar de que los valores de ambas fracciones obtenidas con NaOH 1M casi duplican los correspondientes valores obtenidos al extraer con NaOH 0,1M (Tabla 5). Lo anterior indica, por lo tanto,

el neto predominio de la fracción NH sobre los AF en todos los tratamientos efectuados.

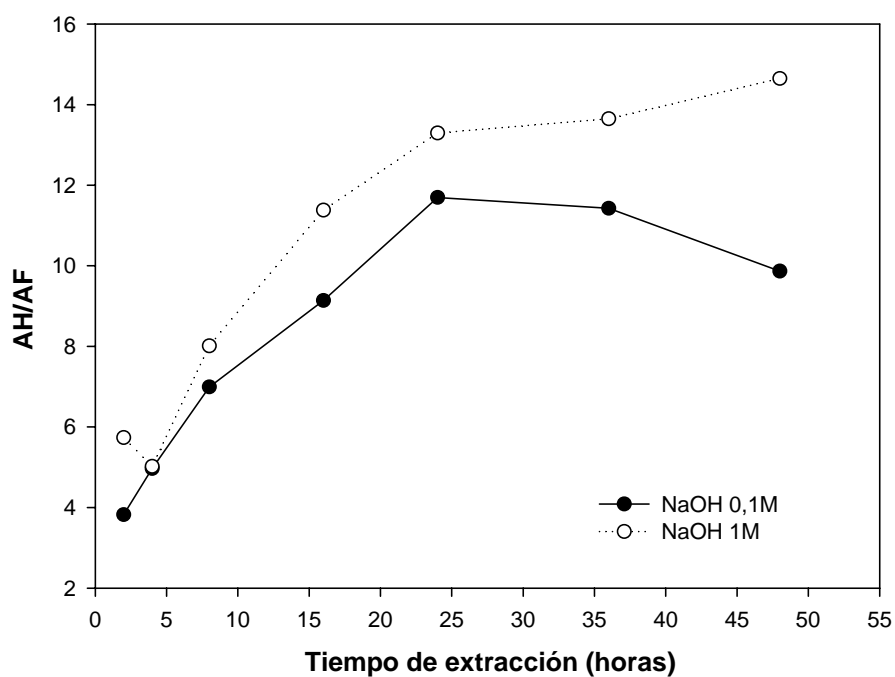


Figura 13. Variación del índice de polimerización ($IP = AH/AF$) con el tiempo de extracción usando NaOH 0,1 y 1M como extractante.

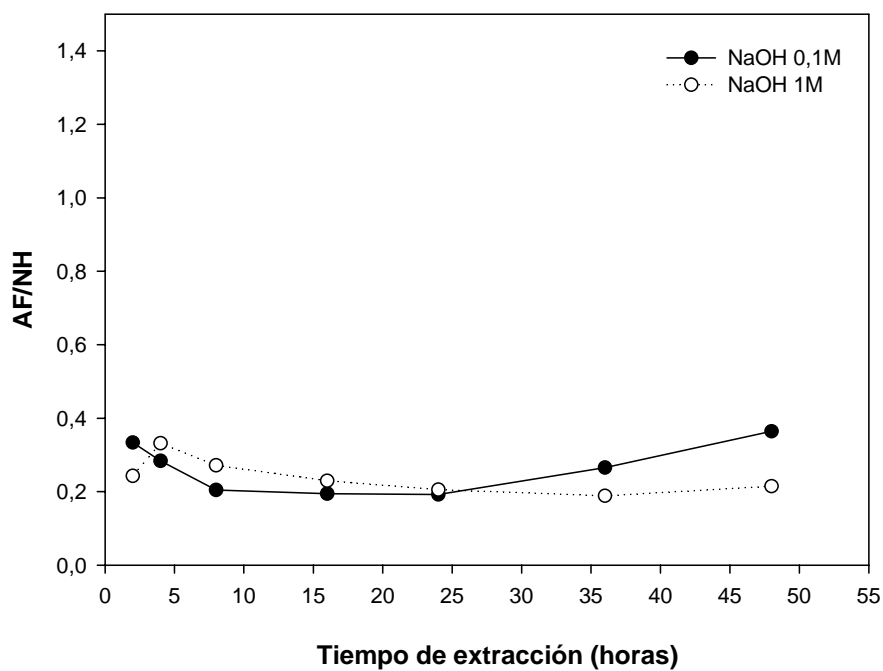


Figura 14. Variación de la relación AF/NH con el tiempo de extracción usando NaOH 0,1 y 1M como extractante.

4.2.2. Efecto sobre el contenido de polifenoles.

La MOS mostró un incremento moderado de su contenido fenólico con el tiempo de extracción, aproximadamente similar para ambas concentraciones de NaOH durante las primeras 16 horas de agitación (Figura 15). Sin embargo, prolongando el proceso extractivo hasta las 48 horas, el NaOH 0,1M apenas solubilizó más componentes fenólicos, mientras que a concentración 1M, el aumento continuó de forma prácticamente lineal durante todo el rango de tiempo estudiado.

Parecido comportamiento se observó en los AH, cuyo contenido fenólico se aproximó al total de la MOS, mientras que el escaso contenido de las fracciones AF y NH, apenas varió a lo largo del tiempo, si bien los valores correspondientes a AF fueron mayores que los de NH, como corresponde a la conocida naturaleza fenólica de los primeros (Sequi y col., 1986).

Utilizando NaOH 0,1M, el porcentaje de carbono de fenoles en el carbono de la MOS y de los AH disminuyó claramente para tiempos de extracción superiores a 16 horas (Tabla 6). Cuando se utilizó la concentración 1M, los valores del citado porcentaje fueron menores que con NaOH 0,1M, con la sola excepción de la extracción de 48 horas. Los AF mostraron en casi todos los casos, una naturaleza fenólica más marcada que los AH y mucho más todavía que la fracción NH, siendo también el carácter fenólico menos evidente en los AF extraídos con NaOH 1M que con la concentración 0,1M como se apreció en los AH.

Se sabe que el tratamiento alcalino de residuos agrícolas ricos en lignina puede romper enlaces entre los monómeros de esta y también entre la lignina y la hemicelulosa, hidrolizando grupos éster del tipo acetato y uronato (Xiao y col., 2001) así como los enlaces éster entre la lignina y hemicelulosa con ácidos hidroxicinámicos como el p-coumarico y ácidos ferúlicos (Spencer y Akin, 1980), dando lugar así a moléculas de naturaleza fenólica que pueden ser detectadas en disolución alcalina. Teniendo en cuenta esto, cabe imaginar en nuestro experimento un importante efecto hidrolítico durante el proceso de extracción alcalina, que liberaría abundantes compuestos fenólicos de elevado volumen molecular (AH), a partir de la lignina. Este efecto debió acentuarse cuando se utilizó el NaOH 1M durante los periodos de tiempo más prolongados.

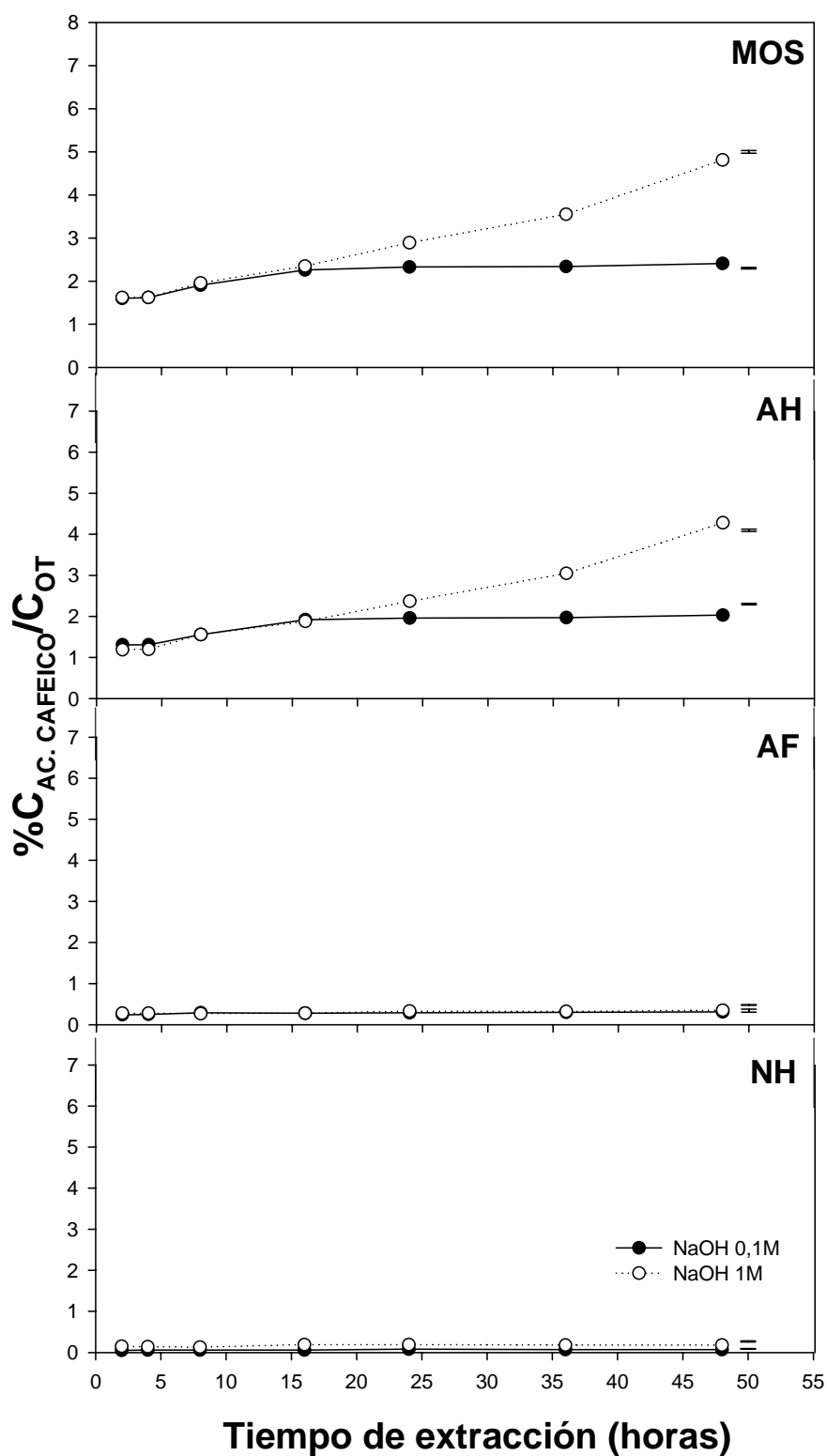


Figura 15. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido de polifenoles en la MOS y en sus fracciones AH, AF y NH (% $C_{AC.CAFEICO}/C_{OT}$ m.s.), a P/V y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa ($P > 0,05$).

Tabla 6. Porcentaje de carbono de polifenoles respecto al carbono total solubilizado en la MOS y en sus fracciones según el tiempo de extracción.

NaOH 0,1M			NaOH 1M		
	Tiempo de extracción (horas)	Polifenoles (%)		Tiempo de extracción (horas)	Polifenoles (%)
MOS	2	12,96	MOS	2	7,11
	4	12,27		4	7,47
	8	13,25		8	7,31
	16	12,65		16	6,11
	24	10,42		24	6,60
	36	8,81		36	7,94
	48	7,90		48	10,62
AH	2	21,69	AH	2	9,47
	4	18,96		4	9,52
	8	19,92		8	8,89
	16	17,96		16	7,00
	24	13,41		24	7,78
	36	10,51		36	9,76
	48	9,19		48	12,82
AF	2	15,19	AF	2	12,79
	4	17,99		4	11,16
	8	25,89		8	12,33
	16	23,93		16	11,86
	24	23,20		24	14,41
	36	18,29		36	13,97
	48	13,84		48	15,35
NH	2	1,06	NH	2	1,66
	4	1,22		4	1,85
	8	1,10		8	1,61
	16	1,00		16	1,85
	24	1,23		24	1,71
	36	1,13		36	1,48
	48	1,14		48	1,70

4.2.3. Efecto sobre el contenido de carbohidratos.

El contenido total de carbohidratos de la MOS aumentó con el tiempo de extracción, presentando máximos a las 48 horas de 3,50 y 8,09% para NaOH 0,1 y 1M, respectivamente (Figura 16). La concentración de extractante afectó principalmente al contenido de carbohidratos de las fracciones AH y NH, obteniéndose como valores medios 2,5 y 3,6 veces más contenido de carbohidratos en ambas fracciones respectivamente, al utilizar NaOH 1M.

El estudio del porcentaje de carbono de glucosa en el carbono de la MOS y de los AH, con ambas concentraciones de NaOH (Tabla 7), mostró valores bajos de esta proporción después de extraer durante las dos primeras horas, pero que se incrementaron rápidamente prolongando el proceso extractivo hasta las 8 horas. La prolongación del proceso, hasta el periodo máximo ensayado de 48 horas, hizo disminuir la citada proporción, aunque sin variaciones importantes entre los diferentes periodos de tiempo experimentados. Para las fracciones AF y NH, los valores de la proporción sugirieron tendencias más erráticas, difíciles de definir. En general, la riqueza de carbohidratos fue mayor en todos los casos cuando la extracción se efectuó con NaOH 1M.

Coelho y col. (1988) sugirieron que los carbohidratos podrían estar unidos a polímeros aromáticos a través de enlaces éster o por grupos amino de aminoazúcares o de unidades aminoacídicas de polisacáridos complejos, pudiendo constituir unidades estructurales de las moléculas de los AH. También se sabe que las hemicelulosas contienen enlaces en su estructura de tipo acetil éter pertenecientes a los grupos hidroxílicos, que pueden verse afectados por el ataque alcalino ocasionado al extraer materia orgánica con NaOH, dando lugar a oligómeros más sencillos (Rajesh y col., 2000), lo que explica el aumento observado de carbohidratos al prolongar los periodos de extracción en nuestro experimento.

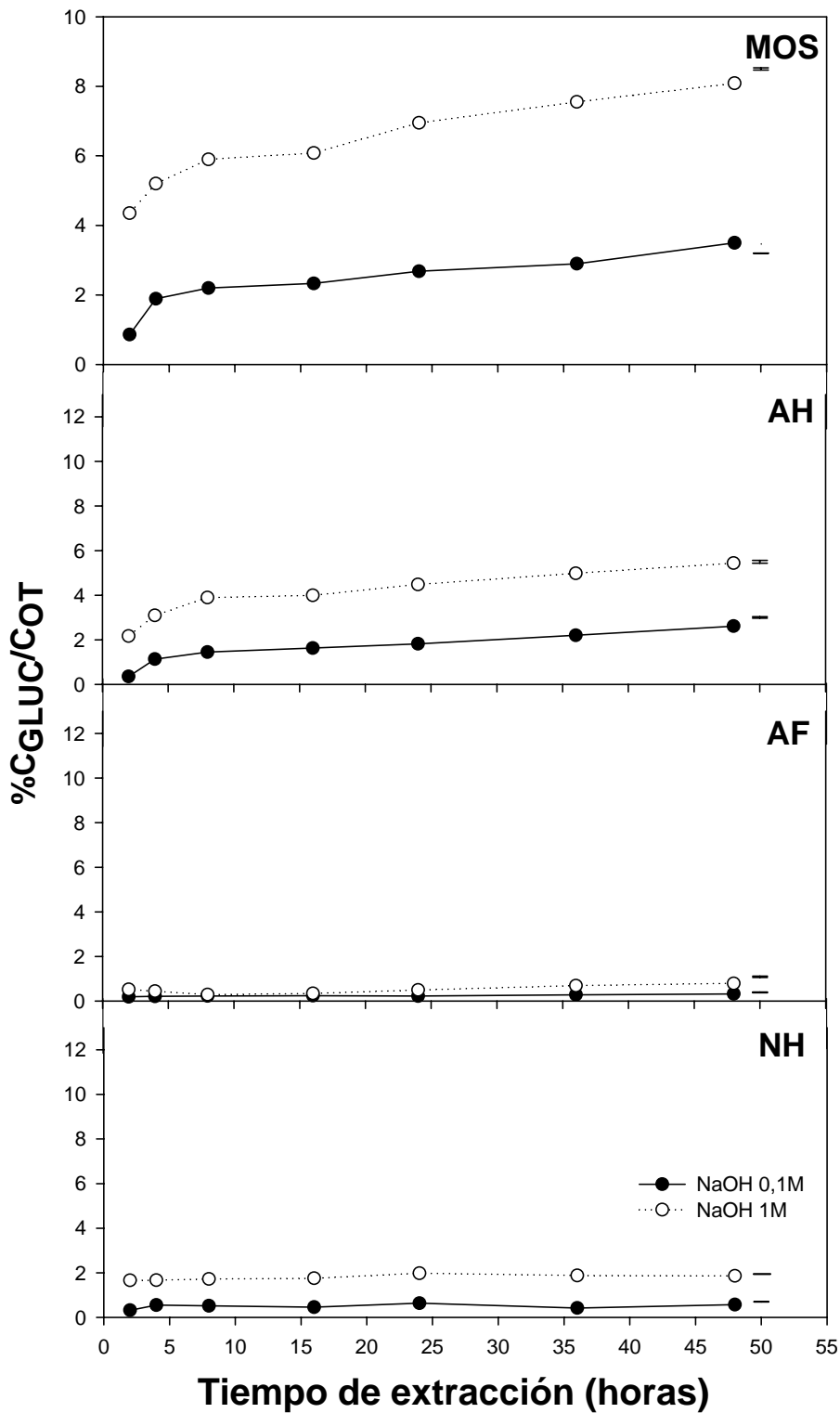


Figura 16. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido de carbohidratos en la MOS y en sus fracciones AH, AF y NH (%CGLUC/COT m.s.), a P/V y temperatura constantes, utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa (P > 0,05).

Tabla 7. Porcentaje de carbono de carbohidratos respecto al carbono total solubilizado en la MOS y en sus fracciones según el tiempo de extracción.

NaOH 0,1M			NaOH 1M		
	Tiempo de extracción (horas)	Carbohidratos (%)		Tiempo de extracción (horas)	Carbohidratos (%)
MOS	2	6,96	MOS	2	19,10
	4	14,32		4	23,99
	8	15,26		8	22,01
	16	13,04		16	15,80
	24	11,98		24	15,87
	36	10,92		36	16,89
	48	11,48		48	17,87
AH	2	5,79	AH	2	17,28
	4	16,35		4	24,52
	8	18,52		8	22,17
	16	15,25		16	14,86
	24	12,45		24	14,71
	36	11,74		36	15,94
	48	11,81		48	16,29
AF	2	12,03	AF	2	23,74
	4	15,11		4	17,53
	8	20,54		8	13,24
	16	20,51		16	14,41
	24	17,60		24	21,40
	36	17,07		36	30,13
	48	14,29		48	34,65
NH	2	6,77	NH	2	18,40
	4	11,22		4	22,06
	8	9,51		8	21,34
	16	7,65		16	17,02
	24	9,85		24	17,79
	36	6,81		36	15,47
	48	9,27		48	17,53

De los resultados obtenidos al estudiar el efecto del tiempo de extracción sobre la obtención de MOS con NaOH 0,1 y 1M, puede concluirse lo siguiente:

El aumento del tiempo incrementó siempre el rendimiento de MOS con las dos concentraciones de NaOH ensayadas, siendo éste claramente superior con NaOH 1M a pesar de que mostró cierta ralentización entre 24 y 48 horas de extracción. Los AH constituyeron la componente mayoritaria de la MOS y se comportaron de modo similar a esta, mientras que los AF fueron la fracción minoritaria y se extrajeron totalmente en las primeras 2 horas de tratamiento. El índice de polimerización AH/AF, se incrementó con el tiempo para ambas concentraciones, siendo siempre mayor con NaOH 1M, si bien la supremacía de los AH sobre los AF se moderó después de 24 horas de tratamiento extractivo. Esto sugiere que la prolongación del tiempo de extracción pudo generar estructuras moleculares más sencillas (cuantificables en la fracción AF) a causa de la probable oxidación de las moléculas de mayor volumen molecular, características de los AH. La relación AF/NH no experimentó cambios relevantes al incrementarse el tiempo de extracción, observándose en todos los tratamientos un neto predominio de la fracción NH sobre la de los AF.

El contenido de fenoles aumentó con el tiempo de extracción, aunque menos con NaOH 0,1M que con 1M, ya que a partir de 16 horas de agitación, apenas se incrementó su concentración en el primer caso, mientras que continuó el crecimiento de forma lineal en todo el rango estudiado, en el segundo caso. El comportamiento de los AH fue parecido al de la MOS, mientras que el escaso contenido fenólico de AF y NH apenas varió con el tiempo, si bien tal contenido en AF fue mayor que en la fracción NH. La proporción de carbono fenólico respecto al carbono de la MOS y los AH, disminuyó para tiempos de extracción superiores a 16 horas, utilizando NaOH 0,1M. Con NaOH 1M, tal proporción fue generalmente menor. Los AF mostraron generalmente valores mayores de esta proporción que la fracción NH, siendo menos evidente el carácter fenólico en los AF con NaOH 1M.

Para el contenido en carbohidratos, el comportamiento fue similar al experimentado por los fenoles mostrando un incremento menos pronunciado, y siendo este más importante durante las primeras horas de extracción. También, el efecto de la concentración de extractante se tradujo en un incremento cuantitativo de los carbohidratos para todas las fracciones estudiadas, sobre todo en AH y NH. Todo lo anterior sugiere una creciente degradación de la celulosa y hemicelulosa favorecida con el aumento del tiempo de extracción y de la concentración de extractante.

4.3. Influencia sobre la solubilidad de la materia orgánica del compost de la aplicación de calor durante periodos crecientes de tiempo, extrayendo durante 24 horas a P/V constante.

4.3.1. Efecto sobre el rendimiento de MOS.

La aplicación de calor para mantener la temperatura a 70°C durante periodos crecientes de tiempo, incrementó el rendimiento extractivo de MOS obteniéndose valores máximos tras 24 horas de tratamiento de 43,23 y 81,33% con NaOH 0,1 y 1M, respectivamente (Tabla 8). La componente mayoritaria de la MOS fue la de los AH y, en menor proporción, la fracción NH como se aprecia en la Figura 17.

La aportación de calor durante el proceso extractivo debió generar cierta degradación de la estructura molecular de los AH, tal y como se aprecia en la Figura 18 por la evolución del índice IP (AH/AF), siendo este efecto especialmente acusado con NaOH 1M tras 8 horas de calentamiento. Tal índice disminuyó, en efecto, desde 23 hasta casi 10 después de las primeras 12 horas de tratamiento a 70°C, lo que sugiere que la MOS sufrió reacciones degradativas que debieron afectar preferentemente a las moléculas de los AH, incrementándose consecuentemente la fracción AF, de menor volumen molecular.

Diversos autores han constatado el efecto de la temperatura durante la extracción de MOS. Yamamoto y col. (1989), trabajando con suelos de tipo *Andisol*, observaron cómo con NaOH 0,1 M a 100 °C se obtenían mayores rendimientos de extracción que a 30 °C. Sin embargo, la estructura molecular de la MOS a ambas temperaturas resultó significativamente diferente, de forma que a menor temperatura el grado de polimerización fue mayor que a 100 °C, sugiriendo que las condiciones alcalinas provocaron una degradación parcial de las estructuras húmicas a alta temperatura, que originaron compuestos de menor volumen molecular.

También Cegarra y col. (1994), extrayendo MOS de turba con KOH, observaron una disminución del IP al aumentar la temperatura desde 20° hasta 80 °C y la concentración desde 0,1 hasta 0,25 M, lo que así mismo relacionaron con posibles reacciones degradativas inducidas por el incremento térmico y la creciente concentración del extractante. Ouatmane (2000), observó igualmente una disminución del citado índice cuando se incrementó al mismo tiempo la temperatura

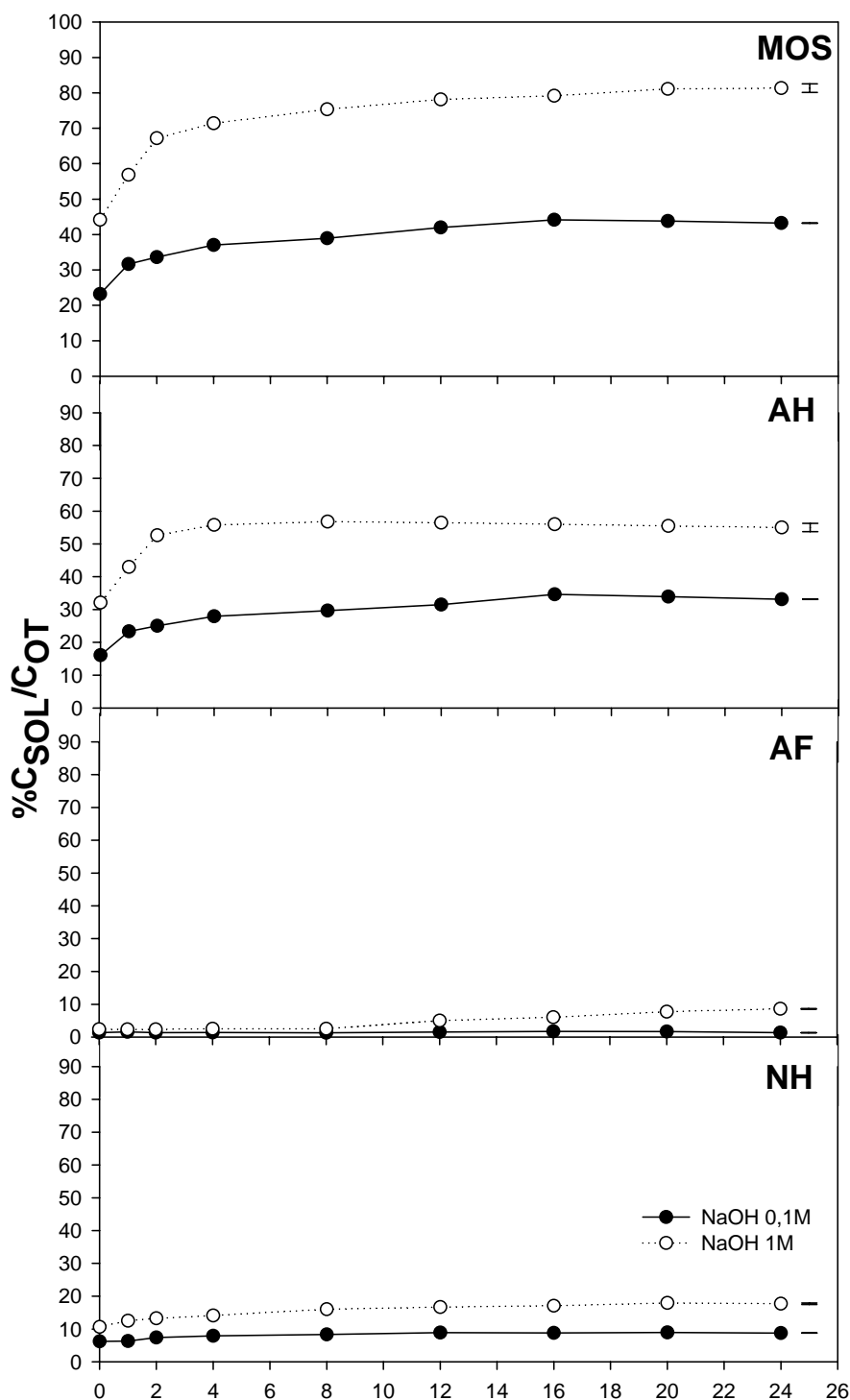
4. Resultados experimentales y discusión

desde 25 hasta 80 °C y la concentración de KOH desde 0,1 hasta 1 M para extraer MOS de diferentes composts.

Tabla 8. Influencia de la aplicación de calor durante periodos crecientes de tiempo sobre el rendimiento de MOS y sus fracciones AH, AF y NH (%C_{SOL}/C_{OT} m.s.), extrayendo durante 24 horas a P/V constante y utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes.

	MOS	AH	AF	NH
Horas de calor (70°C)				
NaOH 0,1 M				
0	23,17 i	16,05 i	1,37 b	6,25 g
1	31,63 h	23,32 h	1,57 a	6,34 f
2	33,58 g	25,04 g	1,34 e	7,40 e
4	37,02 f	27,97 f	1,39 f	7,95 d
8	38,92 e	29,68 e	1,29 h	8,34 c
12	41,96 d	31,53 d	1,53 c	8,90 a
16	44,13 a	34,61 a	1,72 i	8,80 b
20	43,79 b	33,92 b	1,65 g	8,92 a
24	43,23 c	33,12 c	1,34 d	8,77 b
P	***	***	***	***
Horas de calor (70°C)				
NaOH 1 M				
0	44,12 g	32,11 d	2,36 f	10,65 g
1	56,83 f	43,00 c	2,31 f	12,52 f
2	67,18 e	52,63 a	2,33 f	13,22 e
4	71,41 d	55,79 a	2,52 f	14,10 d
8	75,33 c	56,78 a	2,53 e	16,02 c
12	78,12 b	56,46 a	5,01 d	16,65 bc
16	79,13 ab	56,01 a	6,03 c	17,09 b
20	81,10 a	55,47 a	7,70 b	17,93 a
24	81,33 a	55,01 bc	8,60 a	17,72 a
P	***	***	***	***
Interacción	NS	NS	NS	NS

***, **, * y NS: P < 0.001, 0.01 y 0.05 y no significativo, respectivamente. Para cada factor, valores en la misma columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de Duncan a P < 0.05.



Tiempo de aplicación de calor (70°C) durante una extracción de 24 horas

Figura 17. Influencia de la aplicación de calor durante periodos crecientes de tiempo sobre el rendimiento extractivo de la MOS y de sus fracciones AH, AF y NH (% C_{SOL}/C_{OT} m.s.), extrayendo durante 24 horas a P/V constante y utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa ($P > 0,05$).

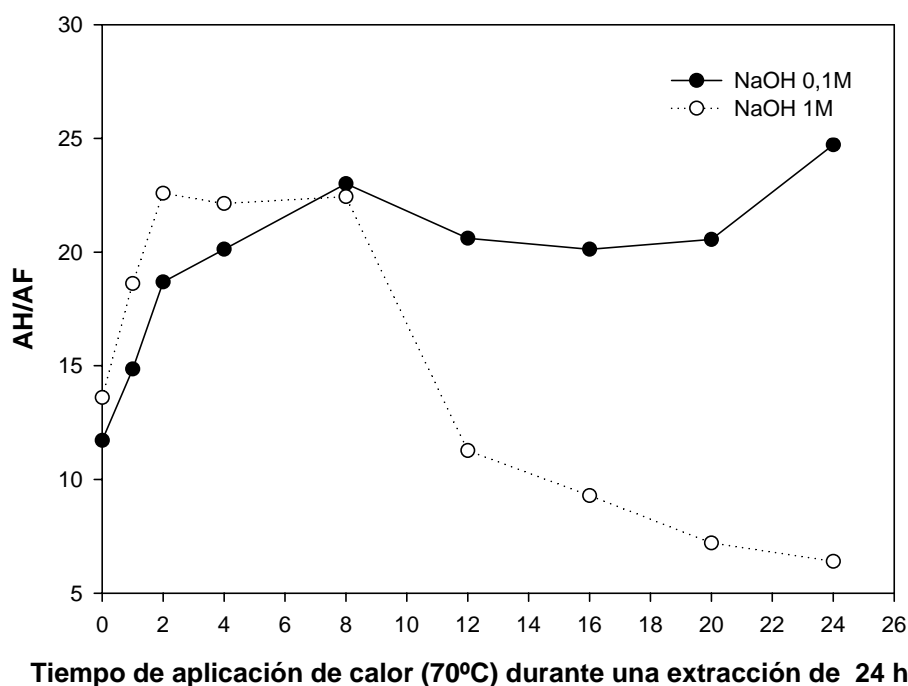


Figura 18. Variación del índice de polimerización ($IP = AH/AF$) con el tiempo de aplicación de calor ($70^{\circ}C$) durante una extracción de 24 horas usando NaOH 0,1 y 1M como extractante.

Los valores de AF y NH, al extraer con NaOH 1M, fueron generalmente el doble, y aún bastante más, de los obtenidos con NaOH 0,1M (Tabla 8), observándose algunos incrementos en la fracción NH, cuando se prolongó la aplicación de calor con el extractante menos concentrado. Con el más concentrado, tales incrementos fueron más importantes en ambas fracciones, y particularmente en AF, como ya se indicó antes de explicar la disminución de AH/AF. La relación AF/NH mostró pocas variaciones al crecer los periodos de calentamiento con NaOH 0,1M (Figura 19), pero sí que aumentó claramente con NaOH 1M manteniendo la temperatura a $70^{\circ}C$ durante periodos de tiempo superiores a 8 horas, de acuerdo con el fuerte incremento de AF.

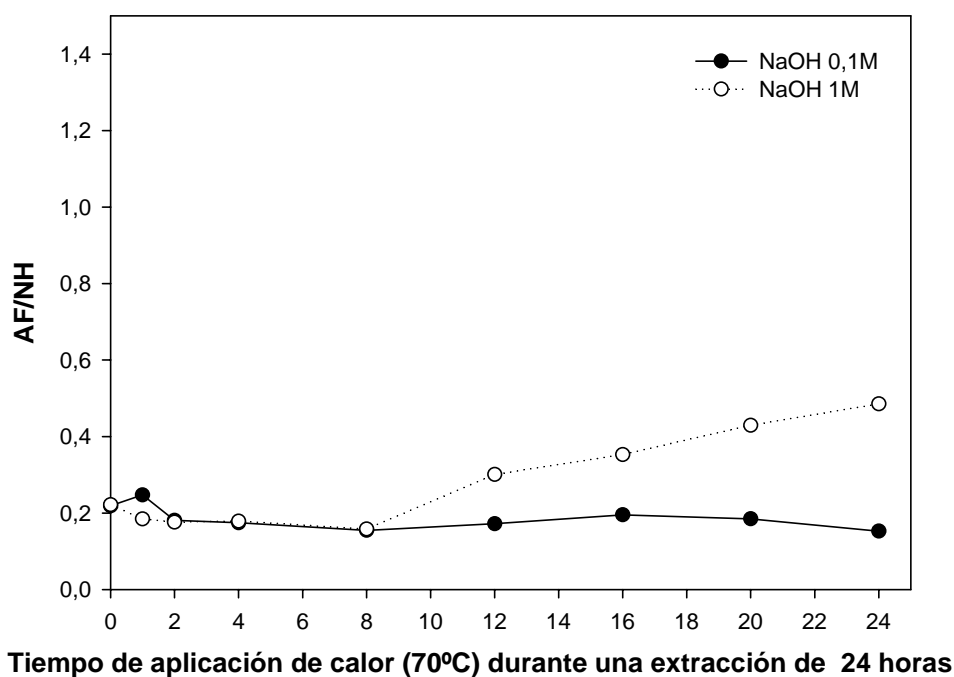
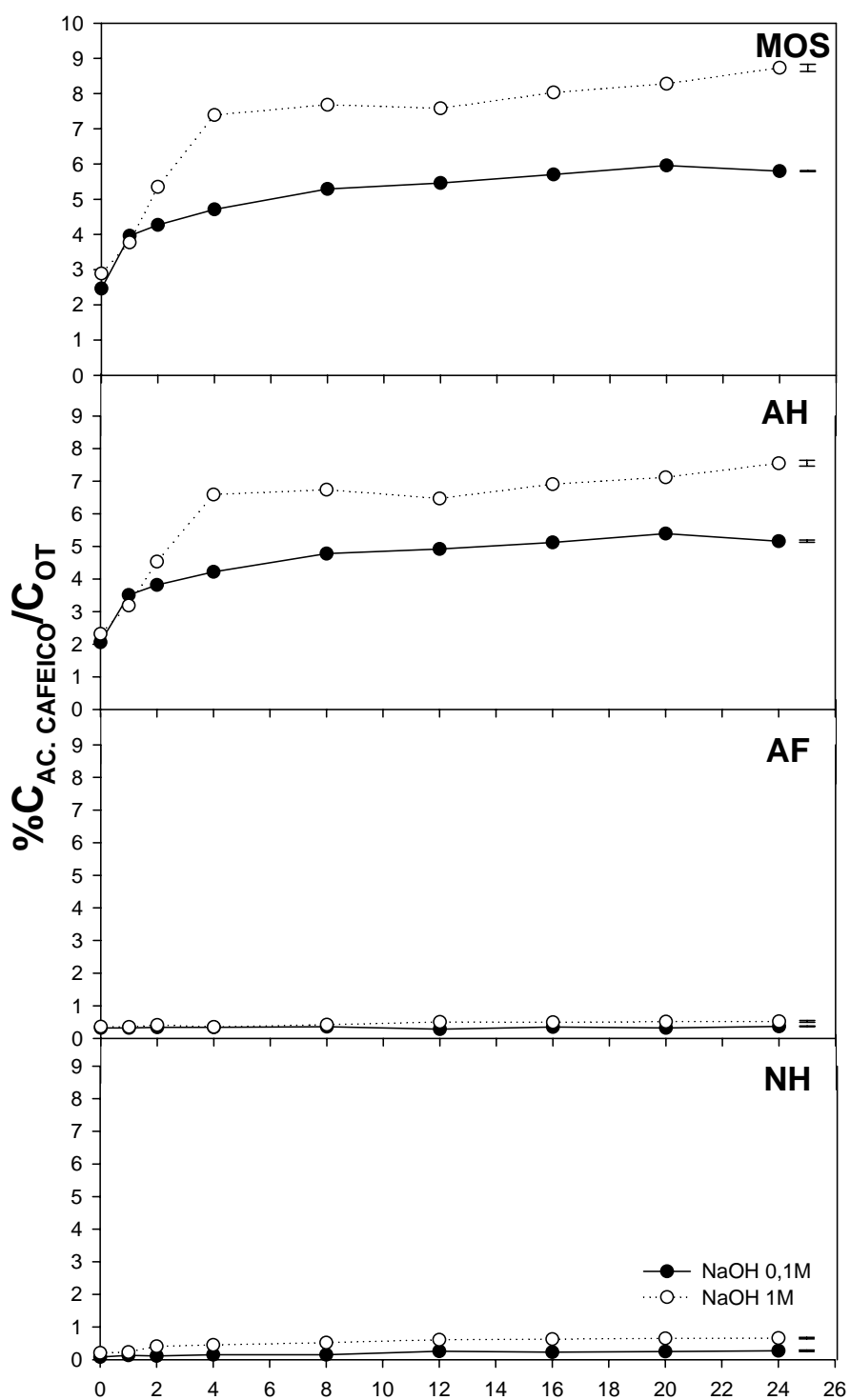


Figura 19. Variación de la relación AF/NH con el tiempo de aplicación de calor (70°C) durante una extracción de 24 horas usando NaOH 0,1 y 1M como extractante.

4.3.2. Efecto sobre el contenido de polifenoles.

El contenido fenólico de la MOS, tanto con NaOH 0,1M como 1M, se incrementó al prolongar los periodos de calentamiento (Figura 20), observándose, los mayores aumentos durante las primeras 2 y 4 horas, y los rendimientos máximos (4,27 y 7,55%), después de 24 horas de tratamiento respectivamente.

El mayor contenido de polifenoles de la MOS se concentró en la fracción AH, ya que tanto en AF y como en NH, la presencia de estos compuestos fue escasa y su concentración, prácticamente no varió con el tiempo de aplicación de calor durante las 24 horas que duraron las extracciones.



Tiempo de aplicación de calor (70°C) durante una extracción de 24 horas

Figura 20. Influencia de la aplicación de calor durante periodos crecientes de tiempo sobre el contenido de polifenoles en la MOS y sus fracciones AH, AF y NH (% $C_{AC.CAFEICO}/C_{OT}$ m.s.), extrayendo durante 24 horas a P/V constante y utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa ($P > 0,05$).

El carbono fenólico, expresado como porcentaje del carbono total de la MOS y de sus fracciones AH y AF (Tabla 9), fue mayor cuando el tratamiento extractivo se efectuó con NaOH 0,1M que con NaOH 1M en concordancia con los resultados anteriores.

En el caso de la MOS y los AH, la primera hora de aplicación de calor incrementó apreciablemente el citado porcentaje, con la concentración baja de NaOH, mientras que fue necesario calentar durante 4 horas para que algo semejante se apreciara con el extractante más concentrado. El mantenimiento de la temperatura elevada durante periodos de tiempo más prolongados, apenas incrementó la riqueza fenólica, permaneciendo los porcentajes en torno a valores de 13 y 10 (MOS), de 15 y 12 (AH), respectivamente para NaOH 0,1 y 1M. La mayor riqueza fenólica se apreció en los AF obtenidos con la menor concentración del extractante (generalmente más del 20%) y, aunque en menor medida, también en los AF extraídos con el NaOH más concentrado con tiempos de calentamiento no superiores a 8 horas.

La degradación química producida por agentes alcalinos sobre biopolímeros vegetales como la lignina, así como el efecto de la temperatura, han sido recogidos ampliamente en la bibliografía (Sjöstrom, 1993). El uso de altas temperaturas se ha utilizado como pretratamiento en los procesos de pulpeo para la elaboración de pastas celulósicas provenientes de la madera, consiguiendo disolver una elevada cantidad de lignina y haciendo que el material resultante incremente su biodegradabilidad al ataque enzimático (Fiala and Nardi, 1985; Hulton y col., 1997). Xu y col. (2005), observaron un aumento en el contenido de aldehídos y ácidos fenólicos como son el ácido ferúlico y p-coumarico, al tratar azúcar de remolacha con NaOH 1M a temperaturas crecientes. También Sun y col. (2001) constataron el efecto de la temperatura durante el tratamiento alcalino utilizando paja de cereal, observando un incremento en la ruptura de enlaces éster entre el ácido ferúlico y p-coumarico y la pared celular, llegando a la conclusión de que el tiempo de cocción era determinante en relación con la temperatura usada en el proceso.

Tabla 9. Porcentaje de carbono de polifenoles respecto al carbono total solubilizado en la MOS y en sus fracciones según el tiempo de trabajo a 70°C durante extracciones de 24 horas.

NaOH 0,1M			NaOH 1M		
	Tiempo (horas) de aplicación de calor (70°C)	Polifenoles (%)		Tiempo (horas) de aplicación de calor (70°C)	Polifenoles (%)
MOS	0	10,62	MOS	0	6,55
	1	12,52		1	6,63
	2	12,72		2	7,96
	4	12,72		4	10,35
	8	13,59		8	10,20
	12	13,01		12	9,70
	16	12,92		16	10,15
	20	13,61		20	10,21
	24	13,42		24	10,73
AH	0	12,83	AH	0	7,23
	1	15,05		1	7,42
	2	15,26		2	8,61
	4	15,09		4	11,81
	8	16,11		8	11,87
	12	15,60		12	11,46
	16	14,79		16	12,34
	20	15,89		20	12,84
	24	15,58		24	13,72
AF	0	23,36	AF	0	15,25
	1	20,38		1	15,15
	2	25,37		2	17,60
	4	24,46		4	13,89
	8	27,91		8	16,60
	12	18,30		12	9,98
	16	20,35		16	8,13
	20	19,39		20	6,62
	24	27,61		24	6,05
NH	0	1,28	NH	0	1,97
	1	2,05		1	1,84
	2	1,49		2	3,10
	4	1,89		4	3,19
	8	1,80		8	3,25
	12	2,92		12	3,66
	16	2,61		16	3,69
	20	2,80		20	3,63
	24	3,08		24	3,72

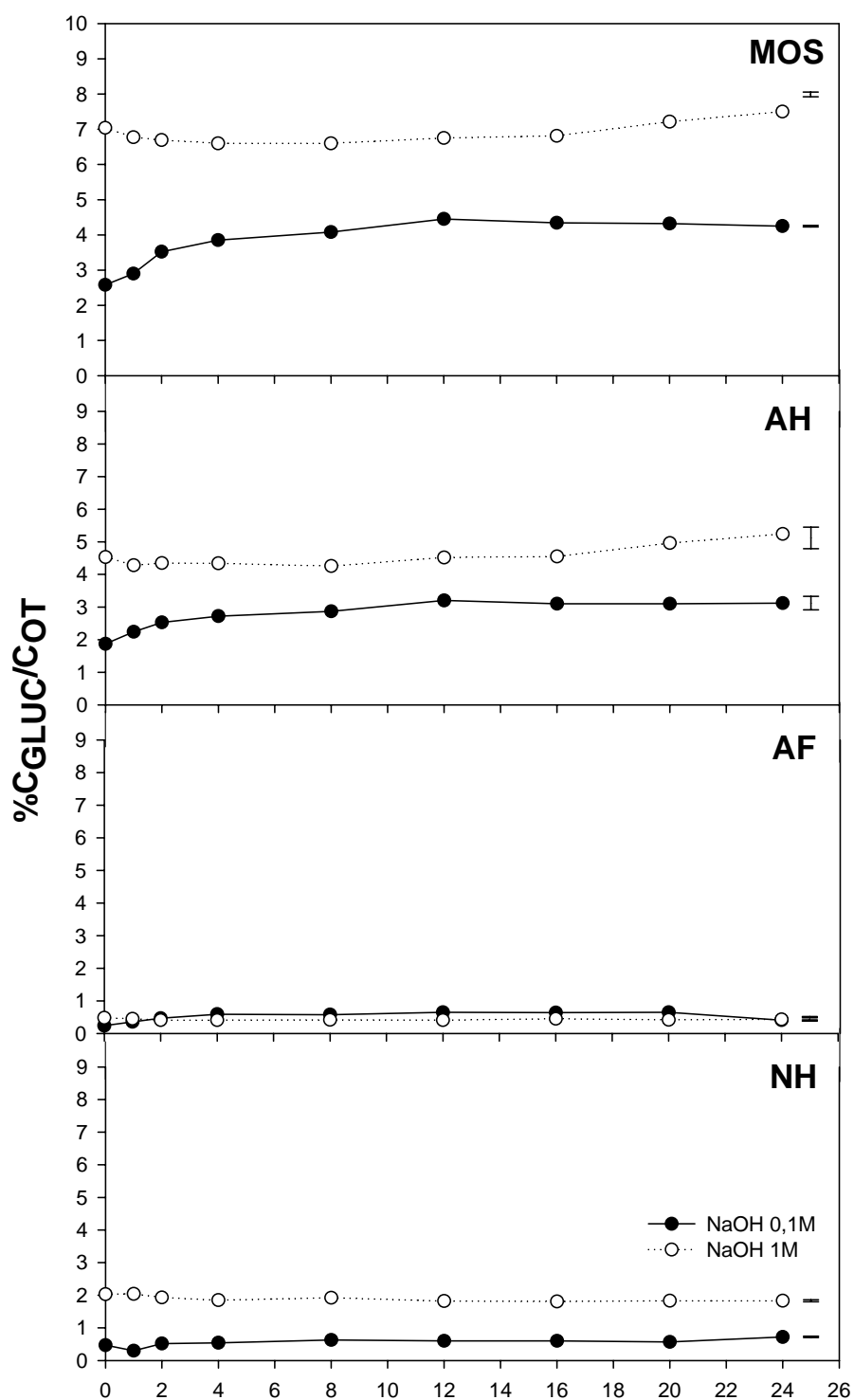
4.3.3. Efecto sobre el contenido de carbohidratos.

Cuando la extracción se efectuó con NaOH 1M durante el periodo ensayado de 24 horas, el contenido total de carbohidratos en la MOS apenas varió por la aplicación de calor (Figura 21). El calor sí que tuvo efecto cuando el tratamiento se efectuó con NaOH 0,1M, si bien el incremento de carbohidratos conseguido fue moderado. Con ambas concentraciones de extractante, los carbohidratos se concentraron mayoritariamente en los AH.

El porcentaje relativo de carbohidratos, expresado como carbono de glucosa respecto al carbono de la MOS y de sus diferentes fracciones (Tabla 10), fue netamente mayor en los AF obtenidos con NaOH 0,1M. La extracción con NaOH 1M no generó diferencias tan apreciables entre las diferentes fracciones de la MOS y, cuando se compararon ambos extractantes entre sí, las diferencias sólo fueron realmente apreciables en AF (menores valores del porcentaje con el álcali concentrado) y NH, en que fueron menores.

Es sabido que los iones hidroxilos pueden causar hidrólisis de enlaces éster y una disminución de enlaces de hidrógeno entre las celulosas y hemicelulosas, dando lugar a una disolución de parte de estas últimas en disoluciones alcalinas (Cyran y col. 2004). La extracción de hemicelulosas bajo condiciones alcalinas implica una hidrólisis de enlaces éster, consiguiendo solubilizarlas de la matriz lignocelulósica y generando así polisacáridos simples. Se sabe también que el efecto de la temperatura durante el tratamiento alcalino de materiales agrícolas lignocelulósicos puede inducir un incremento en la solubilización de los polisacáridos. Así, Xu y col. (2006) trabajando con remolacha de azúcar, consiguieron disolver el 55,5%, 57,3%, 59,1%, 60,9% y 62,1% del contenido total de hemicelulosa mediante una extracción de 18 horas con NaOH 1M, trabajando a temperaturas de 20, 25, 30, 35 y 40° C respectivamente.

Además, usando el mismo residuo agrícola, Sun y col. (2004) observaron un aumento cuantitativo del contenido de hemicelulosa solubilizada con la concentración de NaOH, obteniéndose cerca de un 90,0% del contenido total mediante una extracción con NaOH 2 M durante 2 horas a 55° C y constatando una degradación de estos polisacáridos, que se vio reflejada en un descenso de su peso molecular promedio en peso (M_w).



Tiempo de aplicación de calor (70°C) durante una extracción de 24 horas

Figura 21. Influencia de la aplicación de calor durante periodos crecientes de tiempo sobre el contenido de polifenoles en la MOS y sus fracciones AH, AF y NH (%C_{GLUC}/C_{OT} m.s.), extrayendo durante 24 horas a P/V constante y utilizando NaOH 0,1 y 1M como extractantes. Las barras corresponden a la mínima diferencia significativa (P > 0,05).

Tabla 10. Porcentaje de carbono de carbohidratos respecto al carbono total solubilizado en la MOS y en sus fracciones según el tiempo de trabajo a 70°C durante extracciones de 24 horas.

NaOH 0,1M			NaOH 1M		
	Tiempo (horas) de aplicación de calor (70°C)	Carbohidratos (%)		Tiempo (horas) de aplicación de calor (70°C)	Carbohidratos (%)
MOS	0	9,14	MOS	0	15,96
	1	9,17		1	11,91
	2	10,48		2	9,96
	4	10,40		4	9,24
	8	10,48		8	8,76
	12	10,61		12	8,64
	16	9,83		16	8,61
	20	9,87		20	8,89
	24	9,83		24	9,22
AH	0	11,65	AH	0	14,11
	1	9,61		1	9,95
	2	10,10		2	8,27
	4	9,72		4	7,78
	8	9,67		8	7,50
	12	10,15		12	8,01
	16	8,96		16	8,12
	20	9,14		20	8,94
	24	9,42		24	9,53
AF	0	17,52	AF	0	20,34
	1	22,93		1	19,48
	2	35,07		2	17,60
	4	42,45		4	16,27
	8	44,96		8	16,60
	12	42,48		12	8,18
	16	37,21		16	7,46
	20	39,39		20	5,45
	24	30,60		24	5,00
NH	0	7,52	NH	0	19,06
	1	4,73		1	16,29
	2	7,03		2	14,60
	4	6,79		4	13,12
	8	7,55		8	11,99
	12	6,74		12	10,93
	16	6,82		16	10,59
	20	6,39		20	10,21
	24	8,21		24	10,33

De los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la aplicación de calor para elevar y mantener la temperatura a 70° C durante periodos de tiempo crecientes, hasta 24 horas, sobre la obtención de MOS con NaOH 0,1 y 1M, puede concluirse lo siguiente:

La aplicación prolongada del calor incrementó el rendimiento de MOS extrayendo tanto con NaOH 0,1 M como con NaOH 1M. El rendimiento con el extractante diluido fue aproximadamente el doble que con el concentrado, siendo los AH la componente mayoritaria de la MOS. La disminución del índice de polimerización AH/AF al prolongar el tiempo de aplicación de calor, especialmente acusada con el extractante concentrado, sugiere el desarrollo de reacciones degradativas que debieron afectar preferentemente a las moléculas de los AH. Con NaOH 1M, los valores de las fracciones AF y NH fueron generalmente el doble y, aún bastante más, de los obtenidos con NaOH 0,1 M, mientras que la relación AF/NH apenas varió con el tiempo de calentamiento al utilizar el extractante diluido, pero sí con el concentrado, cuando se prolongó el proceso desde 8 hasta 24 horas.

El contenido fenólico de la MOS se incrementó al prolongar los periodos de calentamiento, apreciándose los mayores aumentos al inicio del tratamiento, 2 horas (NaOH 0,1 M) y 4 horas (NaOH 1M). El mayor contenido se concentró en los AH en ambos casos y el porcentaje de carbono de la MOS, como carbono fenólico, fue también mayor cuando la extracción se efectuó con NaOH 0,1M.

La aplicación de calor durante periodos de tiempo crecientes apenas varió el contenido de carbohidratos en la MOS cuando se utilizó NaOH 1M, pero sí hubo un incremento moderado al extraer con NaOH 0,1M.

5. CONCLUSIONES

De la extracción de la materia orgánica a partir del compost de AL bajo las tres condiciones estudiadas, puede concluirse lo siguiente:

La disminución de la relación P/V con las dos concentraciones de extractante incrementó el rendimiento de MOS, constituyendo los AH la fracción mayoritaria de la misma, si bien se apreció cierto decrecimiento del índice de polimerización AH/AF al efectuar el proceso extractivo con los valores más bajos de la relación, o lo que es lo mismo, con mayores proporciones de extractante. También se incrementó el rendimiento de fenoles y carbohidratos, encontrándose la mayoría de estos compuestos en los AH. Los efectos citados fueron más intensos cuando la extracción se efectuó con NaOH 1 M.

El aumento del tiempo de extracción con NaOH 0,1 y 1 M incrementó también el rendimiento de MOS y el índice de polimerización AH/AF. Los AH constituyeron la fracción mayoritaria, si bien la prolongación del proceso extractivo indujo una cierta despolimerización, probablemente de origen oxidativo. Los valores de la relación AF/NH indicaron el neto predominio de la fracción NH, además de no mostrar cambios relevantes con el tiempo, mientras que sí que se incrementaron los rendimientos de fenoles y carbohidratos prolongando el tiempo de extracción. Los efectos anteriores fueron más pronunciados con el extractante más concentrado.

La extracción con las dos concentraciones ensayadas de NaOH, aplicando calor para elevar la temperatura y mantenerla a 70°C durante periodos crecientes de tiempo, incrementó el rendimiento de MOS e hizo disminuir el índice de polimerización AH/AF, si bien la fracción AH fue siempre predominante a pesar de las posibles reacciones degradativas que sugieren tal disminución. También el extractante concentrado acentuó los efectos descritos comparativamente al diluido e igual sucedió con la relación AF/NH, la cual apenas varió en el primer caso pero sí al utilizar NaOH 1M, incrementándose al prolongar extensamente el tiempo de aplicación de calor. La solubilización de fenoles se incrementó igualmente, encontrándose la mayoría de estos compuestos en los AH, mientras que el rendimiento extractivo de los carbohidratos varió escasamente al incrementar el tiempo de aplicación de calor.

6. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

6.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMPOST DE AL.

6.1.1. Preparación de la muestra.

El compost fue homogenizado mecánicamente en un mezclador-triturador y subdividido en tres muestras, de las cuales una fue empleada para la determinación de la humedad, otra se congeló para el análisis del N-NH₄⁺ debido a su volatilidad y la última se congeló para su liofilización y posterior molienda. Finalmente, se tamizó a través de una malla de 0,5 mm de luz para su análisis.

6.1.2. Humedad.

Se determinó como humedad el porcentaje de agua respecto a muestra húmeda, por diferencia de peso entre material húmedo y seco a 105 °C.

Procedimiento:

Para su determinación se pesa una cantidad de muestra fresca homogeneizada, generalmente entre 50 y 100 g, en un crisol de peso conocido y se calienta a 105 °C durante 24 horas. Se deja enfriar en un desecador y se pesa, la pérdida de peso experimentada se acepta como humedad, expresando el porcentaje respecto a peso de muestra húmeda.

Esta misma operación se repite con las muestras liofilizadas tomando entre 3 y 6 g de muestra en crisoles de peso conocido para calcular su humedad residual (humedad operativa) y poder así expresar los resultados analíticos sobre peso seco.

$$\text{Humedad operativa} = 100 / [100 - \text{humedad de la muestra}]$$

6.1.3. Determinación del pH y de la conductividad eléctrica (CE).

Ambos parámetros se determinaron en el extracto acuoso 1:10 (p/v), después de agitar mecánicamente durante 2 horas la mezcla. El pH se midió en el líquido sobrenadante en un pH-metro con electrodo de vidrio y la CE se determinó con un puente de conductividad después de centrifugar a 8.000g durante 20 minutos y filtrar por malla de fibra sintética. Los resultados de CE se expresaron en dS/m a 25 °C.

6.1.4. Residuo a calcinación (cenizas).

Se determinó según el método de Navarro y col. (1993) tomando como cenizas el residuo obtenido de la calcinación de la muestra a 430 °C. El contenido en cenizas se expresa en porcentaje respecto de muestra seca.

Procedimiento:

Una vez que la muestra ha sido secada a 105 °C para calcular su humedad operativa (apartado 6.1.2.), se calcina por espacio de 24 horas a 430 °C, se deja enfriar en un desecador y se pesa. El contenido en cenizas se expresa en porcentaje respecto de muestra seca.

6.1.5. Materia orgánica (MO).

Se consideró como materia orgánica la pérdida de peso por calcinación a 430°C. Se procede igual que en el apartado 4. La pérdida de peso se expresa como porcentaje de peso de muestra seca.

$$100 = \% \text{ cenizas} + \% \text{ M.O.}$$

6.1.6. Lignina klason.

Se consideró 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, 1977).

Reactivos:

-H₂SO₄ 72%.

Procedimiento:

Se pesa 1 g de muestra (P₁), con precisión de 0,0001 g, se mezcla bien con 15 ml de H₂SO₄ 72% y se deja reposar 12-24 horas. Se transvasa el contenido del vaso a un matraz de 1.000 ml y se añaden 560 ml de agua desionizada para pasar de H₂SO₄ 72% a H₂SO₄ 3%. El matraz se conecta a un refrigerante y se mantiene a ebullición durante 4

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 (P₂).

El sólido filtrado se lava con agua desionizada 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 (P₃). 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 (MOlig). El contenido en lignina se calcula con la siguiente expresión:

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

donde % H es el porcentaje de agua respecto a muestra liofilizada y molida (humedad operativa).

6.1.7. Holocelulosa.

Se consideró como holocelulosa al producto obtenido después de la deslignificación de la muestra y se determinó según la técnica descrita por Browning (1967).

Reactivos:

-Ácido acético glacial.

-Clorito sódico.

Procedimiento:

Se pesan 2 g de muestra (P₁), con precisión de 0,0001 g, en un erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se añaden 63 ml de agua desionizada. 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 los 10 °C. Se filtra en placa filtrante, previamente pesada (P₂) y se lava con agua desionizada hasta la eliminación de la coloración amarilla. Posteriormente se lava con agua desionizada, se deja secar a 60 °C y se pesa (P₃). Al sólido obtenido se le determinan los porcentajes

de humedad (% Hholo) y de la materia orgánica (% MOholo) del mismo modo que en los apartados 6.1.2 y 6.1.4, respectivamente. El contenido de holocelulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

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

Donde % H es el porcentaje de agua con respecto a muestra liofilizada y molida (humedad operativa).

6.1.8. Celulosa.

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

Reactivos:

-Hidróxido sódico 17,5% y 8,3%.

-Ácido acético 10 %.

Procedimiento:

Se pesa 1 g de holocelulosa (P_1), 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 5 minutos se añaden 2,5 ml de NaOH 17,5% hasta consumir un total de 12,5 ml y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16,5 ml de agua desionizada a 20 °C para pasar de NaOH 17,5% a 8,3%, se mezcla bien y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación 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 8,3% y agua desionizada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7,5 ml de ácido acético 10% y se deja en contacto 3 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 del sólido obtenido (% MOcel), del mismo modo que en el apartado 6.1.4 y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\text{Celulosa (\%)} = \frac{(P_3 - P_2) \times (\% \text{ MOcel}) \times (\% \text{ Holocelulosa}) \times 100}{P_1 \times (\% \text{ MOholo}) \times (100 - \% \text{ Hholo})}$$

6.1.9. Hemicelulosa.

El contenido en hemicelulosa se calculó por diferencia entre el contenido de holocelulosa y el de celulosa.

6.1.10. Contenido graso.

Se realizó una extracción en sistema Soxhlet con éter etílico.

Reactivos:

-Éter etílico.

Procedimiento:

Se pesan 2,5 g de muestra con precisión de 0,0001 g. Se realiza una extracción en sistema Soxhlet con éter etílico. Después de recuperar gran parte del éter, el resto de la disolución se filtra por un algodón sobre un vaso seco y pesado previamente. Se deja evaporar el éter que queda y se lleva a continuación a una estufa a una temperatura de 80 °C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se saca de la estufa y se deja enfriar en desecador. El contenido en grasa se calcula por diferencia de pesadas como porcentaje respecto a muestra seca inicial.

6.1.11. Carbono orgánico total (C_{OT}) y nitrógeno total (N_T).

El C_{OT} se determinó por el método de Navarro y col. (1991) de análisis elemental de carbono, 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 realizó también quemando la muestra a 1.020 °C en un analizador elemental con una trampa para retener el CO₂.

Reactivos:

-Atropina (R.A.).

- HCl 1:10 (v/v).

Procedimiento:

La muestra tamizada a 0,5 mm se muele en un mortero 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 adiciones de unas gotas de una disolución de HCl 1:10 (v/v), y posteriormente, se seca en estufa de aire forzado a 40 °C. Para N_T se pesan de 4 a 5 mg de la muestra, con precisión de 0,001 mg. Ambas muestras una vez secas, se introducen en un analizador elemental previamente calibrado con atropina.

6.1.12. Nitrógeno en forma amónica ($N-NH_4^+$).

Se realizó una extracción con KCl 2N de la muestra congelada en la proporción 1:20 (p/v) y agitación mecánica durante 2 horas y posterior medida espectrofotométrica de la intensidad de coloración verde del complejo producido al reaccionar con salicilato sódico en presencia de dicloroisocianurato sódico como fuente de cloro, nitroprusiato sódico como catalizador (Sommers y col., 1992) y citrato sódico como complejante de calcio y magnesio para evitar su precipitación como hidróxidos a valores de pH mayores de 12 (Kempers y Zweers, 1986).

Reactivos:

- KCl 2N.

-*Reactivo A* (preparar diariamente): se disuelven 7,813 g de salicilato sódico (R.A.) y 25 mg de nitroprusiato sódico (R.A.), y se enrasan juntos a 100 ml con agua desionizada.

-*Reactivo B*: se disuelven 4,0 g de NaOH y se adiciona 0,5 g de dicloroisocianurato sódico (R.A.), se enrasan juntos a 100 ml con agua desionizada (pH 13).

-*Reactivo C*: se disuelven 9,33 g de citrato sódico (R.A.) y se enrasan a 100 ml con agua desionizada.

Procedimiento:

Extracción 1:20 (p/v) con KCl 2N de la muestra fresca, descongelada previamente, agitación mecánica durante dos horas, centrifugación a 8.000g durante

15 minutos y filtrado por papel lavado a los ácidos. La recta patrón se construye a partir de una de disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,880 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se lleva a 1.000 ml con agua desionizada) que contiene 400 ppm de nitrógeno en forma amónica y se obtienen disoluciones que contengan exactamente 5, 10, 15, 20 y 25 ppm de nitrógeno en forma amónica. Para la determinación del NH_4^+ se toman 0,4 ml del extracto problema 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 la absorbancia a $\lambda = 660 \text{ nm}$ y se determina la concentración de NH_4^+ respecto a la recta patrón.

6.1.13. Nitrógeno en forma de nitrato (N-NO_3^-).

Medida del nitrógeno en forma de NO_3^- en un cromatógrafo iónico HPLC.

Procedimiento:

Se realiza una extracción de la muestra con agua desionizada en la proporción 1:20 (p/v) agitando mecánicamente durante 2 horas. Se centrifuga a 8.000g y se filtra por papel lavado a los ácidos. La cantidad de muestra diluida en la proporción adecuada con agua desionizada, calidad HPLC, se inyecta en el cromatógrafo iónico previamente calibrado con una disolución de NaNO_3 preparada recientemente (6 ppm de NO_3^-) y se obtiene la lectura directa de la concentración en el extracto.

En ocasiones también se empleó para su determinación la medida el electrodo selectivo de nitrato, ajustando la fuerza iónica con un 2% de una disolución de 600 g/l de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante del electrodo.

6.1.14. Carbono orgánico hidrosoluble (C_{OH}).

Se determinó el carbono orgánico extraído con agua desionizada en un analizador de carbono TOC/ Skalar por combustión a alta temperatura con oxidación catalítica y detección infrarroja.

Reactivos:

- Hidrógeno ftalato de potasio anhidro (R.A.).
- Na_2CO_3 (R.A.).
- $NaHCO_3$ (R.A.).
- H_3PO_4 2%.

Procedimiento:

Se realiza una extracción con agua desionizada en la proporción 1:20 (p/v) durante dos horas. Se centrifuga a 15.000g durante 20 minutos. El sobrenadante se filtra por una malla de fibra sintética, para eliminar las partículas sólidas que pudieran haber quedado en suspensión. Se introduce una alícuota de este filtrado en el analizador de carbono TOC con una dilución adecuada.

El carbono total de la muestra se mide frente a una recta patrón preparada con hidrógeno ftalato de potasio anhidro en el intervalo 0-2.000 ppm y el carbono inorgánico frente a una recta patrón preparada con Na_2CO_3 / $NaHCO_3$ (intervalo de 0 a 1.000 ppm). El contenido en carbono orgánico total (C_{OT}) se obtendrá por diferencia entre el carbono total (C_T) y el carbono inorgánico (C_I).

$$C_T = C_{OT} + C_I$$

6.1.15. Polifenoles hidrosolubles.

Se determinó mediante una modificación del método Folin (Maestro-Durán y col., 1991) sobre el mismo extracto obtenido en para la determinación del C_{OH} (apartado 11).

Reactivos:

- Na_2CO_3 20%.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (R.A.).
- Ácido cafeico (R.A.).

Procedimiento:

La recta patrón se prepara a partir de una disolución de 60 ppm de ácido cafeico. En matraces aforados de 50 ml se añaden 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la disolución anterior, posteriormente se adiciona 2,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu, se agita y tras 3

minutos se añaden 5 ml de una disolución de Na_2CO_3 20% y se llevan a enrase con agua desionizada. A 0,5 ml del extracto acuoso problema, en matraces aforados de 50 ml, se adiciona 2,5 ml de Folin-Ciocalteu y 5 ml de Na_2CO_3 20% como en la recta patrón y se lleva a enrase. Estas disoluciones y las de la recta patrón se dejan en reposo 1 hora, y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a $\lambda = 725$ nm, calculándose la concentración de polifenoles respecto a la recta patrón.

6.1.16. Carbohidratos hidrosolubles.

Se determinó como glucosa por el método de la antrona descrito por Brink y col. (1959) sobre el mismo extracto obtenido en para la determinación del C_{OH} (apartado 11).

Reactivos:

-Disolución de antrona (R.A.) al 0,2% en H_2SO_4 concentrado (debe estar recién preparada).

-Glucosa (R.A.)

Procedimiento:

Se prepara una recta patrón a partir de una disolución de 0,2 g/litro de glucosa. Se toma 1 ml de extracto acuoso problema o de la recta patrón y se le añaden 5 ml de disolución de antrona 0,2%, 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 $\lambda = 625$ nm y se determina la concentración de carbohidratos respecto a la recta patrón.

6.1.17. Capacidad de cambio de cationes (CCC).

Se realizó la saturación del complejo de cambio con bario y la determinación del catión retenido por diferencia con un blanco (Lax y col., 1986).

Reactivos:

-Agua exenta de CO_2 : se hierve agua desionizada, eliminándose así el aire que está disuelto, y una vez fría se satura de aire sin CO_2 , pasando el aire a través de una

disolución de NaOH al 10% y de un tubo con cal sodada.

-*Disolución A de Mehlich* (Mehlich, 1948): se disuelven 90 ml de Trietanolamina (R.A.) en 1 litro de agua exenta de CO₂ y se añade HCl 1:10 (v/v) hasta ajustar el pH a 8,1, posteriormente se enrasa a 2 litros con agua exenta de CO₂.

A continuación se disuelven 100 g de BaCl₂·2H₂O y se enrasan a 2 litros con agua exenta de CO₂. Finalmente, las disoluciones de trietanolamina y BaCl₂ se mezclan.

-*Disolución B de Mehlich*: se disuelven 50 g de BaCl₂·2H₂O y se enrasan a 4 litros con agua exenta de CO₂.

-(NH₄)₂SO₄ 1N.

-HCl 1:1 y 1:10 (v/v).

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. Se añaden 25 ml de agua desionizada exenta de CO₂ y se deja reposar durante 2 horas, se filtra y se repite la operación con otras 3 fracciones más de agua desionizada, para eliminar los sulfatos presentes en la muestra. El filtrado se desprecia.

Se añaden 25 ml de reactivo A de Mehlich, y se deja percolar a una velocidad de 10-12 gotas por minuto, recogiendo el percolado en un vaso de precipitado 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 vaso de precipitado. Se lava dos veces con 25 ml de agua cada vez y una tercera con 75 ml, recogiéndose siempre los percolados en el mismo vaso. Paralelamente se prepara un blanco con 25 ml de reactivo A y 25 ml de B en un vaso de precipitado al que se ha agregado 5 ml de HCl (1:1).

Todos los vasos se calientan en una plancha hasta reducir el volumen a la mitad, y entonces se añaden 15 ml de (NH₄)₂SO₄ 1N para precipitar el BaSO₄. Una vez fríos los precipitados se filtran 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 capacidad de cambio de cationes (CCC), expresada en meq/100 g de muestra.

$$\text{CCC (meq/100 g)} = [(\text{BaSO}_4 \text{ blanco} - \text{BaSO}_4 \text{ problema}) \times 856,9] - 3,36$$

(3,36 es la capacidad de cambio del carbón activo)

6.1.18. Mineralización de la muestra.

Se efectuó la digestión nítrico-perclórica de las muestras según el método recomendado por Abrisqueta y Romero (1969).

Reactivos:

- HNO_3 ($d = 1,33$) R.A.

- HClO_4 60 % (R.A.).

- HCl 0,5 N.

Procedimiento:

En un tubo de digestión con enrase hasta 50 ml se pesa aproximadamente 0,25 g de muestra con una precisión de 0,0001 g. Se añaden 3 ml de mezcla $\text{HNO}_3 / \text{HClO}_4$ (2:1) y se deja macerar durante 3 ó 4 horas. Se calienta a 150 °C durante 1 hora y a 210 °C durante 2 horas en bloque digestor. Una vez terminada la digestión, las paredes y fondo del tubo se lavan con HCl 0,5 N hasta llevar el volumen a 25 ml y a continuación se filtra con papel lavado a los ácidos.

6.1.19. Fósforo total.

Se determinó espectrofotométricamente la intensidad de la coloración amarilla producida por el complejo fosfovanadato molibdato amónico (Kitson y Mellon, 1944), obtenida sobre una fracción del extracto de mineralización.

Reactivos:

-*Reactivo A*: se disuelven 100 g de molibdato amónico (R.A.), se añaden 10 ml de hidróxido amónico concentrado (R.A.), y se enrasan a 1.000 ml con agua desionizada.

-*Reactivo B*: se disuelven 2,35 g de metavanadato amónico (R.A.), se añaden 7 ml de HNO_3 concentrado (R.A.), y se enrasan a 1.000 ml con agua desionizada.

-Reactivo C: se mezclan 100 ml de reactivo A, 100 ml de reactivo B y 97 ml HNO₃ concentrado, y se enrasan a 1.000 ml con agua desionizada.

Procedimiento:

La recta patrón se prepara a partir de una disolución de fosfato monopotásico R.A.(4,3937 g y se llevan hasta 1.000 ml con agua desionizada) que contiene 1 mg de fósforo por ml y se prepara una nueva disolución que contenga 4 mg de fósforo por 100 ml. En tubos de ensayo se pone: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la disolución anterior, se añaden 5, 4, 3, 2, 1 y 0 ml de agua desionizada respectivamente y se mezcla bien. Estas disoluciones son equivalentes a muestras de extracto que contengan 0, 8, 16, 24, 32 y 40 ppm de fósforo.

Para la determinación de fósforo se toman 5 ml del extracto de mineralización de la muestra y de la recta patrón y se adicionan 5 ml de la disolución del reactivo C, se mezcla bien y se deja en reposo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 460 nm, y se determina la concentración de fósforo respecto a la recta patrón.

6.1.20. Sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso, cinc, cromo, níquel, plomo y cadmio.

El Na y el K se midieron por fotometría de llama en diluciones adecuadas del extracto de mineralización. El resto de elementos se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica, en diluciones adecuadas del extracto de mineralización de las muestras y frente a patrones preparados en la misma matriz que la muestra. El Ca y el Mg se midieron en presencia de LaCl₃ del 0,2 % para evitar el efecto de interferentes.

6.1.21. Carbono extraíble (C_{EX}).

Se determinó el carbono extraído con una disolución de hidróxido sódico en un analizador de carbono TOC/ Skalar.

Reactivos:

-NaOH 0,1M.

Procedimiento:

Se realiza una extracción en la proporción 1:20 (p/v) con NaOH 0,1M. Se agita mecánicamente durante 24 horas y se centrifuga a 15.000g durante 20 minutos, y se filtra por malla de fibra sintética. Se toma una alícuota del filtrado y se procede del mismo modo que para el C_{OH} (apartado 6.1.14).

6.2.22. Fraccionamiento de ácidos húmicos (AH) y fracción fúlvica (FF).

Para su determinación se precipitaron los ácidos húmicos a pH 2 en el extracto de hidróxido sódico obtenido en el apartado 6.1.18. (Cegarra y col., 1974).

Reactivos:

- H_2SO_4 concentrado (R.A.).

Procedimiento:

Una vez obtenido el extracto de materia orgánica con NaOH 0,1M, se adiciona ácido sulfúrico concentrado (R.A.) hasta alcanzar un $pH < 2$. Se deja en reposo a 4 °C durante 24 horas, para conseguir una completa precipitación de los ácidos húmicos. Estos se separan del sobrenadante (fracción fúlvica) por decantación y posterior centrifugación a 15.000g durante 20 minutos. En la fracción fúlvica, se determina el carbono (C_{FF}) como se hace para el carbono extraíble mientras que el carbono de los ácidos húmicos (C_{AH}) se calcula por diferencia del carbono extraíble y el carbono de ácidos fúlvicos, expresando el resultado en porcentaje:

$$C_{AH} (\%) = C_{EX} (\%) - C_{FF} (\%).$$

6.1.23. Índice de germinación (IG).

Se determinó de acuerdo con la técnica propuesta por Zucconi y col. (1981).

Reactivos:

-Etanol 50%.

Procedimiento:

Se humedece el material hasta alcanzar el 60% de humedad y se deja en reposo durante 30 minutos. Se añaden 13,5 ml de agua desionizada por g de muestra seca, para diluir este extracto hasta el 10% y se filtra por 0,45 μm . En placas Petri de 10 cm de diámetro, cubiertas con papel de filtro, se ponen 8 semillas y se añade 1 ml del extracto acuoso, realizándose 10 repeticiones.

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 cuantifica el número de semillas germinadas y la longitud alcanzada por 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), ambos respecto al control, y dividir por cien.

$$\text{IG (\%)} = (\%G \times \%L) / 100$$

6.2. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LA MOS.

6.2.1. Extracción de MOS.

La extracción de la MOS en las distintas condiciones estudiadas se realizó con botes de agitación de polietileno de relación altura/base 3. Todas las extracciones fueron en condiciones isotérmicas (25° y 70°C) y se realizaron en un baño de agua con control de temperatura con un sistema de agitación horizontal incorporado.

Procedimiento:

Las extracciones se realizan con NaOH 0,1 y 1 M en las distintas condiciones que se resumen a continuación:

- Relación P/V: 1/4, 1/5, 1/10, 1/20 y 1/40 durante 24 horas y 25°C.

- Tiempo de extracción: 2, 4, 8, 16, 24, 36 y 48 horas a P/V 1/20 y 25 °C.
- Se incrementa la temperatura de 25° a 70°C con periodos crecientes de calentamiento (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas) durante extracciones de 24 horas usando una P/V de 1/20.

Las extracciones obtenidas se centrifugan a 15.000g durante 20 minutos, y se filtran por malla sintética.

6.2.2. Fraccionamiento de ácidos húmicos (AH) y fracción fúlvica (FF).

Precipitación de los ácidos húmicos a pH 2 en el extracto de NaOH (Cegarra y col., 1974).

Procedimiento:

Una vez obtenido el extracto de materia orgánica para cada caso, se adiciona H₂SO₄ concentrado hasta un pH de 2. Se deja en reposo a 4 °C durante 24 horas, para conseguir una completa precipitación de los AH. Estos se separan del sobrenadante (FF) por decantación y posterior centrifugación a 15.000g durante 20 minutos filtrándose finalmente por malla de fibra sintética.

6.2.3. Fraccionamiento de ácidos fúlvicos (AF) y fracción no humificada (NH).

La fracción fúlvica FF se divide en dos subfracciones por medio de un gel de polivinilpirrolidona (PVP), que separa los verdaderos AF, los cuales quedan retenidos en dicho gel, de la fracción NH, la cual pasa a través de la columna de PVP.

Reactivos:

- Polivinilpirrolidona (R.A.).
- H₂SO₄ 0,1 y 0,01N.
- NaOH 0,5M.

Procedimiento:

Preparación de la polivinilpirrolidona (PVP).

Se introducen 50 gr. de PVP insoluble en un matraz y/o erlenmeyer de 1000 ml y se añaden 100-150 ml de agua hasta que el gel quede cubierto completamente tras lo cual se agita enérgicamente. Se deja reposar 15 minutos con el fin de eliminar por decantación la fracción más fina y se repite la operación dos veces. A continuación seguimos lavando la resina dos veces con agua destilada descartando siempre la fracción más fina en suspensión. Seguidamente se lava dos veces más con H_2SO_4 0,1 N, otra con NaOH 0,5 M, después con agua y finalmente tres veces con H_2SO_4 0,1 N. Con el último lavado dejamos el gel cubierto para que así se pueda conservar a temperatura ambiente.

Preparación de las columnas de PVP.

Las columnas se preparan en jeringas hipodérmicas de plástico de 10 ml. En la base de la jeringa se coloca una capa de aproximadamente 0.5 cm de lana de vidrio que impide la salida del gel. Las jeringas se fijan en un soporte rígido en posición vertical y no se deben mover tras ser rellenadas con la resina. Tras añadir el PVP a las jeringas se deja sedimentar hasta que el gel alcance una altura de 6-9 ml. Una vez hecho esto la columna es repetidamente lavada antes de su uso. Primero con agua destilada, a continuación dos veces más con H_2SO_4 0,01 N seguido por NaOH 0,5 M y otra vez con agua destilada. Finalmente la resina es equilibrada antes de pasarle la muestra lavándola tres veces con H_2SO_4 0,01 N.

Una precaución importante a tener en cuenta es no dejar secar nunca las columnas cuando son utilizadas.

Una vez hecho esto se cogen 5 ml de la disolución obtenida tras la precipitación de los ácidos húmicos (AF + NF) y se pasan por la columna. La fracción no retenida (NH) es eluida de la columna con H_2SO_4 0,01 N enrasando a continuación en un matraz aforado de 25 ml.

6.2.4. Carbono orgánico soluble de MOS y sus fracciones.

Se determinó el carbono orgánico soluble de la MOS y de las fracciones FF y NH utilizando un analizador de carbono TOC-SKALAR según el mismo procedimiento que para el C_{OH} (apartado 6.1.14.), expresándose los resultados como rendimiento

extractivo calculado como el porcentaje de carbono obtenido con respecto al C_{OT} del compost seco ($\%C_{SOL}/C_{OT}$).

Para AH y AF, se calculó por diferencia usando las siguientes expresiones:

$$\% C_{MOS}/C_{OT} = \% C_{AH} /C_{OT} + \% C_{FF} /C_{OT}$$

$$\% C_{FF}/C_{OT} = \% C_{AF} /C_{OT} + \% C_{NH} /C_{OT}$$

6.2.5. Polifenoles solubles de MOS y sus fracciones.

Se determinaron los polifenoles solubles de la MOS y de las fracciones FF y NH según el mismo procedimiento usado para los polifenoles hidrosolubles (apartado 6.1.15.), expresándose los resultados como porcentaje de carbono de ácido cafeico (usado como patrón en la determinación de los polifenoles) con respecto C_{OT} del compost seco ($\% C_{ÁC.CAFEICO}/C_{OT}$).

Para AH y AF, se calculó por diferencia usando las siguientes expresiones:

$$\% C_{ÁC.cafeicoMOS} /C_{OT} = \% C_{ÁC.cafeicoAH} /C_{OT} + \% C_{ÁC.cafeicoFF} /C_{OT}$$

$$\% C_{ÁC.cafeicoFF} /C_{OT} = \% C_{ÁC.cafeicoAF} /C_{OT} + \% C_{ÁC.cafeicoNH} /C_{OT}$$

6.2.6. Carbohidratos solubles de MOS y sus fracciones.

Se determinaron los carbohidratos solubles de la MOS y de las fracciones FF y NH según el mismo procedimiento usado para los carbohidratos hidrosolubles (apartado 6.1.16.) expresándose como porcentaje de carbono de D-glucosa (usada como patrón en la determinación de los carbohidratos) con respecto C_{OT} del compost seco ($\%C_{GLUC}/C_{OT}$).

Para AH y AF, se calculó por diferencia usando las siguientes expresiones:

$$\% C_{glucMOS} /C_{OT} = \% C_{glucAH} /C_{OT} + \% C_{glucFF} /C_{OT}$$

$$\% C_{glucFF} /C_{OT} = \% C_{glucAF} /C_{OT} + \% C_{glucNH} /C_{OT}$$

7. BIBLIOGRAFÍA

-
- A.A.O. **2005**. Agencia para el aceite de oliva. En: <http://www.mapya.es/aao/default.htm>.
- Abrisqueta, C., and M. Romero. **1969**. Digestión húmeda rápida de suelos y materiales orgánicos. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 27:855-867.
- Achard, F.K. **1786**. (*ver Stevenson 1994*).
- Adani, F.P., P.L. Genevini, and F. Tambone. **1995**. A new index of organic matter stability. *Compost Science and Utilization*. 3:25-37.
- Alba Mendoza, J., F. Hidalgo Casado, F. Martínez Román, M.A. Ruiz Gómez, and M.J. Moyano Pérez. **1993**. Procesos de elaboración: nuevas técnicas de centrifugación. . VI Simposium Científico-Técnico Expoliva 93. Jaén. Dossier Oleo. 2:40-59.
- Alburquerque Méndez, J.A. **2003**. El compostaje de orujo de oliva de dos fases. Estudio del proceso y evaluación de los productos obtenidos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología.
- Alburquerque, J.A., J. Gonzalvez, D. Garcia, and J. Cegarra. **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., J. Gonzalvez, D. Garcia, and J. Cegarra. **2006a**. Effects of bulking agent on the composting of "alperujo", the solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Process Biochemistry* 41:127-132.
- Alburquerque, J.A., J. Gonzalvez, D. Garcia, and J. Cegarra. **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* 64:470-477.
- Alburquerque, J.A., J. Gonzalvez, D. Garcia, and J. Cegarra. **2006c**. 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., J. Gonzalvez, D. Garcia, and J. Cegarra. **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.
- Andersen, R.A., and J.A. Sowers. **1968**. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry*. 7:293-301.
- ANSI/ASTM. **1977a**. Standard test methods for lignin in wood D 1106-56. American National Standard Institute, Washington DC.
- ANSI/ASTM. **1977b**. Standard test methods for alpha-cellulose in wood D 1103-60. American National Standard Institute, Washington DC.
- Ayuso, M., T. Hernández, and C. García. **1996**. Effect of humic fractions from urban wastes and other more evolved organic materials on seed germination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 72:461-468.
- Ayuso, M., J.L. Moreno, T. Hernandez, and C. Garcia. **1997**. Characterisation and evaluation of humic acids extracted from urban waste as liquid fertilisers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75:481-488.
- Baddi, G.A., J.A. Alburquerque, J. Gonzalvez, J. Cegarra, and M. Hafidi. **2004**. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54:39-44.
- Baeta-Hall, L., M. Céu Sàágua, M. Lourdes Bartolomeu, A. Anselmo, and M. Fernanda Rosa. **2005**. Biodegradation of olive oil husks in composting aerated piles. *Bioresource Technology*. 96:69-78.
- Bernal, M.P., C. Paredes, M.A. Sánchez-Monedero, and J. Cegarra. **1998**. Maturity and stability parameters of compost prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*. 63:91-99.
- Berzelius, J.J. **1839**. (*ver Stevenson 1994*).
- Billa, E., E.G. Koukios, and B. Monties. **1998**. Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. *Polymer Degradation and Stability Biodegradable Polymers and Macromolecules* 59:71-75.
- Borja, R., B. Rincón, F. Raposo, E. Sánchez, and A. Martín. **2004**. Assessment of kinetic parameters for the mesophilic anaerobic biodegradation of two-phase olive pomace. *International Biodeterioration & Biodegradation* 53:71-78.

-
- Bramryd, T. **1980**. The role of peatlands for the global carbon dioxide balance. *Proceedings of the 6th International Peat Congress* 9-11.
- Brink, R.H.J., P. Dubach, and D.L. Lynch. **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.
- Burdon, J. **2001**. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Science* 166:752-769.
- Caravaca, F., G. Tortosa, L. Carrasco, J. Cegarra, and A. Roldan. **2006**. Interaction between AM fungi and a liquid organic amendment with respect to enhancement of the performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*. *Biology and Fertility of Soils* 43:30-38.
- Cayuela, M.L., M.A. Sanchez-Monedero, and A. Roig. **2006**. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry* 41:616-623.
- Cegarra, J., L. Reverte, A. Lax, and C. F. **1974**. Factores que influyen en la extracción y fraccionamiento de la materia orgánica del suelo. *Anales de Edafología y Agrobiología* 33:575-590.
- Cegarra, J. **1978**. Fraccionamiento de fertilizantes orgánicos y de sus productos de humificación. Tesis Doctoral. CEBAS-CSIC. Murcia.
- Cegarra, J., D. Garcia, A. Navarro, and M.P. Bernal. **1994**. Effects of heat on the alkali extraction of humic substances from peat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 25:2685-2695.
- Cegarra, J., J.A. Albuquerque, J. Gonzalez, G. Tortosa, and D. Chaw. **2006**. Effects of the forced ventilation on composting of a solid olive-mill by-product ("alperujo") managed by mechanical turning. *Waste Management* 26:1377-1383.
- Ciavatta, C., L. Vittori Antisari, and P. Sequi. **1988**. A first approach to the characterization of the presence of humified materials in organic fertilizers. *Agrochimica* XXXII:510-517.
- Ciavatta, C., M. Govi, A.L. Vittori, and P. Sequi. **1990**. Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. *Journal of Chromatography* 509:141-146.
- Ciavatta, C., and M. Govi. **1993**. Use of insoluble polyvinylpyrrolidone and isoelectric focusing in the study of humic substances in soils and organic wastes. *Journal of Chromatography A* 643:261-270.
- Clapp, C.E., and M.H.B. Hayes. **1999**. Sizes and shapes of humic substances. *Soil Science* 164:777-789.
- Clemente, R., A. Escolar, and M.P. Bernal. **2006**. Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology* 97:1894-1901.
- Coelho, R.R., L.F. Linhares, and J.P. Martín. **1988**. Sugars in hydrolysates of fungal melanins and soil humic acids. *Plant and Soil* 106:127-133.
- Cole, M.A., L. Zhang, and X. Liu. **1995**. Remediation of pesticide contaminated soil by planting and compost addition. *Compost Science & Utilization* 3:20-30.
- Costa, F., C. García, T. Hernández, and A. Polo. **1991**. *Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización*. Ed.: CSIC-CEBAS, Murcia. ISBN: 84-404-9422-X.
- Cyran, M., C.M. Courtin, and J.A. Delcour. **2004**. Heterogeneity in the fine structure of alkali-extractable arabinoxylans isolated from two rye flours with high and low breadmaking quality and their coexistence with other cell wall components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2671-2680.
- Chefetz, B., P.G. Hatcher, Y. Hadar, and Y. Chen. **1996**. Chemical and biological characterization of organic matter during composting of municipal solid waste. *Journal of Environmental Quality*. 25:776-785.
- Cheshire, M.V., P.A. Cranwell, C.P. Falschaw, A.J. Ford, and R.D. Haworth. **1967**. Humic acid II. Structure of humic acids. *Tetrahedron*. 23:1667-1682.
- De Nobili, M., G. Bragato, and A. Mori. **1999**. Capillary electrophoretic behaviour of humic substances in physical gels. *Journal of Chromatography A* 863:195-204.
- De Saussure, T. **1804**. (*ver Stevenson 1994*).
- Derriche, R., and K.S. Berrahmoune. **2007**. Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering* 78:1149-1154.

-
- Dick, W.A., and E.L. McCoy. **1993**. Enhancing soil fertility by addition of composts. Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects. Eds.: Harry A. J. Hoitink and Harold M. Keener. Renaissance Publications. Ohio.
- Dragunov, C.C., H.H. Zhelokhovtseva, and E.J. Strelkova. **1948**. A comparative study of soil and peat humic acids. *Pochvovedenie*. 7:409-420.
- Ertel, J.R., Behmel, P., Christman, R.F., Flaig, W.J.A., Haider, K.M., Harvey, G.R., Hatcher, P.G., Hedges, J.I., Martin, J.P., Pfaender, F.K., Schulten, H.R. **1988**. Genesis Group Report. En: Humic substances and Their Role in the Environment. Ed.: Frimmel, F.H., and Christman, R.F. John Wiley & Sons Limited.
- Estaún, V., C. Calvet, M. Pagés, and J.M. Grases. **1996**. Chemical determination of fatty acids, organic acids and phenols, during olive marc composting process. *Acta Horticulturae* 172:263-270.
- Fiala, W., and F. Nardi. **1985**. The NACO process. *Paper Technology and Industry* 3:75-79.
- Filippi, C., S. Bedini, R. Levi-Minzi, R. Cardelli, and A. Saviozzi. **2002**. Co-composting of olive mill by-products: Chemical and microbiological evaluations. *Compost Science & Utilization*. 10:63-71.
- Finstein, M.S., F.C. Miller, S.T. MacGregor, and K.M. Psarianos. **1985**. The Rutgers strategy for composting: process design and control. EPA Project Summary, EPA 600/S2-85/059, Cincinnati, Ohio.
- Finstein, M.S., and J.A. Hogan. **1993**. Integration of composting process microbiology, facility structure and decision-making. Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects. Eds.: Harry A. J. Hoitink and Harold M. Keener. Renaissance Publications. Ohio.
- Flaig, W. **1966**. The Chemistry of Humic Substances. The Use of Isotopes in Soil Organic Matter Studies, Report of FAO/IAEA Technical Meeting, Pergamon, New York.
- Flaig, W., W. Beutelspacher, and E. Rietz. **1975**. Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances. *Soil Components: Vol. 1. Organic Components* J.E. Gieseking, Ed., Springer-Verlag, New York.
- Flaig, W. **1988**. Generation of model chemical precursors. Humic Substances and Their Role in the Environment. Eds: F.H. Frimmel and R.F. Christman.
- Francioso, O., C. Ciavatta, V. Tugnoli, S. Sánchez-Cortés, and C. Gessa. **1998**. Spectroscopic characterization of pyrophosphate incorporation during extraction of peat humic acids. *Soil Science Society of America Journal* 62:181-187.
- Fuchs, W. **1931**. (*ver Stevenson 1994*).
- Fujitake, N., A. Kusumoto, M. Tsukamoto, M. Kawahigashi, T. Suzuki, and H. Otsuka. **1998**. Properties of soil humic substances in fractions obtained by sequential extraction with pyrophosphate solutions at different pHs. I. Yield and particle size distribution. *Soil Science and Plant Nutrition*. 44:253-260.
- García, C., T. Hernández, F. Costa, B. Ceccanti, and A. Polo. **1992a**. A comparative chemical structural study of fossil humic acids and those extracted from urban wastes. *Resources Conservation and Recycling*. 6:231-241.
- García, C., T. Hernández, and F. Costa. **1992b**. Comparison of humic acids derived from city refuse with more developed humic acids. *Soil Science and Plant Nutrition*. 38:339-346.
- García, D., J. Cegarra, M.P. Bernal, and A. Navarro. **1993a**. Comparative-evaluation of methods employing alkali and sodium pyrophosphate to extract humic substances from peat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 24:1481-1494.
- García, D., J. Cegarra, M. Abad, and F. Fornes. **1993b**. Effects of the extractants on the characteristics of a humic fertilizer obtained from lignite. *Bioresource Technology* 43:221-225.
- García, D., J. Cegarra, A. Roig, and M. Abad. **1994**. Effects of the extraction temperature on the characteristics of a humic fertilizer obtained from lignite. *Bioresource Technology*. 47:103-106.
- García, D., J. Cegarra, and M. Abad. **1996**. A comparison between alkaline and decomplexing reagents to extract humic acids from low rank coals. *Fuel Processing Technology* 48:51-60.

-
- García Gómez, A. **2001**. Obtención y utilización agrícola de composts de origen agroindustrial. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología.
- Giusquiani, P.L., G. Gigliotti, D. Businelli, and A. Macchioni. **1994**. Spectroscopic comparison between humic and fulvic acids from urban waste compost and soil. *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*, ed. N. Senesi & T.M. Miano. Elsevier, New York.
- González Vicente, J. **2005**. Estudio del compostaje de orujo de oliva de dos fases y de la materia orgánica soluble extraída durante el proceso. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología.
- Gumuskaya, E., and M. Usta. **2006**. Dependence of chemical and crystalline structure of alkali sulfite pulp on cooking temperature and time. *Carbohydrate Polymers In Press*, Corrected Proof.
- Harada, Y., and A. Inoko. **1980**. Relationship between cation-exchange capacity and degree of maturity of city refuse composts. *Soil Science and Plant Nutrition* 26:353-362.
- Hatcher, P.G., Breger, I.A., Maciel, G.E., Szeverenyi, N.M. **1985**. *Geochemistry of humin. Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. Ed: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy.
- Hatcher, P.G., Faulon, J.L., Clifford, D.A., Mathews, J.P. **1994**. A Three-dimensional Structural Model for Humic Acids from Oxidized Soil. *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Ed: N. Senesi and T.M. Miano. Elsevier Science B.V.
- Häusler, M.J., and M.H.B. Hayes. **1996**. Uses of the XAD-8 resin and acidified dimethylsulfoxide in studies of humic acids. *Humic Substances and Organic Matter in Soil and Water Environments: Characterization, Transformations and Interactions*. C.E. Clap, M.H.B. Hayes, N. Senesi, and S.M. Griffith (eds.) IHSS, The University of Minnesota, St. Paul, pp. 25-32.
- Hermoso Fernández, M., M. Uceda Ojeda, J. González Delgado, and J. Morales Bernardino. **1993**. Extracción de aceite de oliva mediante sistemas continuos de 2 fases. *Agricultura* 730:394-399.
- Hervas, L., C. Mazuelos, N. Senesi, and C. Saiz-Jimenez. **1989**. Chemical and physico-chemical characterization of vermicomposts and their humic acid fractions. *The Science of the Total Environment* 81-82:543-550.
- Hobson, R.P., and H.J. Page. **1932**. Studies on the carbon and nitrogen cycles of the soil. *Journal of Agricultural Science*. 22:297-299; 497-515; 516-526.
- Hoitink, H.A.J., W. Chen, M.I. Trillas-Gay, and Y.R. Chung. **1987**. Compost for control of plant diseases. *Compost: production, quality and use*. Eds.: M. de Bertoldi, M.P. Ferranti, P.L. Hermite and F. Zucconi. Elsevier Applied Science Publishers. Barking.
- Huang, G., J.X. Shi, and T.A.G. Langrish. **2007**. NH₄OH-KOH pulping mechanisms and kinetics of rice straw. *Bioresource Technology* 98:1218-1223.
- Hue, N.V., and J. Liu. **1995**. Predicting compost stability. *Compost Science & Utilization* 3:8-15.
- Hultom, T., B. Lonnberg, T. Laxen, and M. ElSakhawy. **1997**. Alkaline pulping of cereal straw. *Cellulose Chemistry and Technology* 31:65-75.
- Iglesias Jiménez, E., and V. Pérez García. **1992**. Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 38:331-343.
- Inbar, Y., Y. Chen, and H.A.J. Hoitink. **1993**. Properties for establishing standards for utilization of composts in container media. *Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects*. Eds.: Harry A. J. Hoitink and Harold M. Keener. Renaissance Publications. Ohio.
- Takezawa, M., T. Nishida, and Y. Takahara. **1992**. Structural characteristics of humic acids extracted from woody composts by two-step composting process. *Soil Science and Plant Nutrition*. 38:85-92.
- Keener, H.M., C. Marugg, R.C. Hansen, and H.A.J. Hoitink. **1993**. Optimizing the efficiency of the composting process. *Science and Engineering of Composting: design, environmental, microbiological and utilization aspects*. Eds.: Harry A. J. Hoitink and Harold M. Keener. Renaissance Publications. Ohio.
- Kempers, A.J., and A. Zweers. **1986**. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 17:715-723.

-
- Kitson, R.E., and M.G. Mellon. **1944**. Colorimetric determination of P as a molybdovanadato phosphoric acid. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry (Analytical Section)*. 16:379-383.
- Kohler, J., **Tortosa, G.**, Cegarra, J., Caravaca, F. y Roldán A. **2007**. Influence of dissolved organic matter from composted "*alperujo*" on introduced single or mixed AM fungi with regard to plant growth and microbiological activity and structural stability in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *Waste Management*.(enviado para revisión).
- Kononova, M.M. **1966**. *Soil Organic Matter*. Pergamon, Elmsford, New York.
- Kumada, K. **1983**. Carbonaceous materials as a possible source of soil humus. *Soil Science and Plant Nutrition*. 29:383-386.
- Lawson, G.J., and D. Stewart. **1989**. Coal Humic acids. *Humic substances II*. Ed: M.H.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm, R.S. Swift.
- Lax, A., A. Roig, and F. Costa. **1986**. A method for determining the cation-exchange capacity of organic materials. *Plant and Soil*. 94:349-355.
- Linares, A., J.M. Caba, F. Ligeró, T. de la Rubia, and J. Martínez. **2003**. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidio-alba*. *Chemosphere* 51:887-891.
- Loveland, P., and J. Webb. **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.
- Lowe, L.E. **1975**. Fractionation of acid-soluble components of soil organic matter using polyvinylpyrrolidone. *Canadian Journal of Soil Science*. 55:119-126.
- Madejon, E., E. Galli, and U. Tomati. **1998**. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica* 42:135-146.
- Maestro-Durán, R., R. Borja Padilla, A. Martín Martín, J.A. Fiestas Ros de Ursinos, and J. Alba Mendoza. **1991**. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechin. *Grasas y Aceites*. 42:271-276.
- Maillard, L.C. **1903**. (*ver Stevenson 1994*).
- Maillard, L.C. **1916**. Synthèse de matières humiques par action des acides amines sur les sucres reducteurs. *Ann. Chem. Phys.* 5:258-317.
- Mehlich, A. **1948**. Determination of cation and anion exchange properties of soils. *Soil Science*. 66:429-445.
- Miikki, V., N. Senesi, and K. Hänninen. **1997**. Characterization of humic material formed by composting of domestic and industrial biowastes. Part 2. Spectroscopic evaluation of humic acid structures. *Chemosphere*. 34:1639-1651.
- Mulder, G.J. **1862**. (*ver Stevenson 1994*).
- Navarro, A. **1990**. Relaciones entre carbono orgánico y materia orgánica en residuos y subproductos orgánicos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- Navarro, A.F., J. Cegarra, A. Roig, and M.P. Bernal. **1991**. An automatic microanalysis method for the determination of organic carbon in wastes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 22:2137-2144.
- Navarro, A.F., J. Cegarra, A. Roig, and D. García. **1993**. Relationship between organic matter and carbon contents of organic wastes. *Bioresource Technology*. 44:203-207.
- Quatmane, A. **2000**. Etude du compostage de quelques déchets organiques: I-Approche physico-chimique, calorimétrique et spectroscopique de l'étude de l'état de maturation des composts. II- Analyse qualitative et quantitative de la fraction humique. PhD Thesis. Université Cadi Ayyad. Faculté des Sciences.
- Ozores-Hampton, M., and T.A. Obreza. **2000**. Composted waste use on Florida vegetable crops: A review. *Proceedings of the International Composting Symposium (ICS'99)*. Eds.: P.R. Warman and B.R. Taylor. Halifax, Canada. 2.
- Page, H.J. **1930**. (*ver Stevenson 1994*).
- Paulet, S. **2000**. Informe final convenio ESAB-Servei del Medi Ambient de la Diputació de Barcelona.
- Piccolo, A., and A. Mirabella. **1987**. Molecular weight distribution of peat humic substances extracted with different inorganic and organic solutions. *Science of the Total Environment*:39-46.

-
- Piccolo, A., G. Celano, and G. Pietramellara. **1993**. Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed-germination and growth of seedlings (*Lactuca-Sativa* and *Lycopersicon-Esculentum*). *Biology and Fertility of Soils* 16:11-15.
- Rajesh, J., M. Sjöstedt, and W. Glasser. **2000**. Thermoplastic xylan derivatives with propylene oxide. *Cellulose* 7:319 - 336.
- Ranalli, A., and N. Martinelli. **1995**. Integral centrifuges for olive oil extraction, at the third millenium threshold. Transformation yields. *Grasas y aceites*. 46:255-263.
- Roletto, E., and P. Ottino. **1984**. Analytical characterization of humic substances from composted lignocellulosic residues. *Agricultural Wastes* 11:181-195.
- Saiz-Jimenez, C. **1994**. Modern concepts on the origin and structure of terrestrial humic substances: The alkylaromatic network approach. *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Ed: N. Senesi and T.M. Miano. Elsevier Science B.V.
- Sánchez-Monedero, M.A., A. Roig, C. Martínez-Pardo, J. Cegarra, and C. Paredes. **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.
- Schnitzer, M. **1978**. *Humic Substances: Chemistry and Reactions*. Soil Organic Matter Ed: M. Schnitzer and S.U. Khan.
- Schnitzer, M., D.A. Hindle, and M. Meglic. **1986**. Supercritical gas extraction of alkanes and alkanolic acids from soils and humic materials. *Soil Science Society of America Journal* 50:913-919.
- Senesi, N., T.M. Miano, and G. Brunetti. **1996**. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Ed. A. Piccolo.
- Sequi, P., M. de Nobili, L. Leita, and G. Cercignani. **1986**. A new index of humification. *Agrochimica* XXX:1-2.
- Shmook, A. **1930**. (*ver Stevenson 1994*).
- Sjöstrom, E. **1991**. Carbohydrate degradation products from alkaline treatment of biomass. *Biomass and Bioenergy* 1:61-64.
- Sjöstrom, E. **1993**. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*, Second Edition. Helsinki University of Technology, Espoo, Finland ISBN: 0-12-647481-8.
- SODEAN. **2005**. Potencial aprovechamiento energético de la biomasa del olivar en Andalucía. En: www.sodean.es/publicaciones/potencial_y_aprovechamiento.pdf.
- Sommers, S.G., V. Kjellerup, and O. Kristjansen. **1992**. Determination of total ammonium nitrogen in pig and cattle slurry: sample preparation and analysis. *Acta Agric. Scand. Sect. B, Soil Plant Science*. 42:146-151.
- Spencer, R.R., and D.E. Akin. **1980**. Rumen microbial-degradation of potassium hydroxide-treated coastal bermudagrass leaf blades examined by electron-microscopy. *Journal of Amino Acid Science* 51:1189-1196.
- Stevenson, F.J. **1982**. *Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. Wiley, New York.
- Stevenson, F.J. **1985**. Geochemistry of soil humic substances. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. Ed: G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy.
- Stevenson, F.J. **1994**. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions* (2nd Edition). John Wiley & Sons, Inc.
- Sun, R.-C., X.-F. Sun, and S.-H. Zhang. **2001**. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:5122-5129.
- Sun, J.X., X.F. Sun, R.C. Sun, and Y.Q. Su. **2004**. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 56:195-204.
- Sutton, R., and G. Sposito. **2005**. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental Science & Technology* 39:9009-9015.
- Tardáguila, J., F. Montero, M. Olmeda, J. Alba, and R. Bernabéu. **1996**. Análisis del sector del aceite de oliva. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Abril.
- Thaer. **1809**. (*ver Stevenson 1994*).

-
- Tomar, N.K., R.P. Yadav, and P.S. Relan. **1992**. Characterization of humic and fulvic acids extracted with NaOH and NaOH-Na-pyrophosphate mixture from soils of arid and subhumid regions. 1. Analytical characteristics. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 6:177-185.
- Tomati, U., E. Madejon, E. Galli, D. Capitani, and A.L. Segre. **2001**. Structural changes of humic acids during olive mill pomace composting. *Compost Science & Utilization*. 9:134-142.
- Tonelli, D., R. Seeber, C. Ciavatta, and C. Gessa. **1997**. Extraction of humic acids from a natural matrix by alkaline pyrophosphate. Evaluation of the molecular weight of fractions obtained by ultrafiltration. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359:555-560.
- Trubetskaya, O.E., Trubetskoj, O.A., Ciavatta, C. **2001**. Evaluation of the transformation of organic matter to humic substances in compost by coupling sec-page. *Bioresource Technology* 77:51-56.
- Van der Hoek, K.W., and J. Oosthoek. **1985**. Composting: odour emissions and odour control by biofiltration. *Composting of Agricultural and other wastes*. Ed.: J.K.R. Gasser. Elsevier Applied Science Publishers. Barking.
- Veeken, A., K. Nierop, V. de Wilde, and B. Hamelers. **2000**. Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. *Bioresource Technology* 72:33-41.
- Waksman, S.A. **1930**. (*ver Stevenson 1994*).
- Waksman, S.A. **1936**. (*ver Stevenson 1994*).
- Walmsley, M.E. **1973**. Physical and chemical properties of peat. *Muskeg and the Northern Environment in Canada* (N.W. Radforth and C.O. Brawner, eds.). University of Toronto Press, Toronto.
- Watanabe, A., and S. Kuwatsuka. **1992**. Chemical characteristics of soil fulvic acids fractionated using polyvinylpyrrolidone (PVP). *Soil Science and Plant Nutrition*. 38:31-41.
- Widayati, S., and K.H. Tan. **1997**. Atomic force microscopy of humic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28:189-196.
- Wikander, G., and B. Nordén. **1988**. Investigations of paramagnetic species in peat. *Soil Science*. 145:289-297.
- Xiao, B., X.F. Sun, and R. Sun. **2001**. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability* 74:307-319.
- Xu, F., R.-C. Sun, J.-X. Sun, C.-F. Liu, B.-H. He, and J.-S. Fan. **2005**. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica Chimica Acta* 552:207-217.
- Xu, F., J.X. Sun, C.F. Liu, and R.C. Sun. **2006**. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research* 341:253-261.
- Yamamoto, S., T. Honna, O. Miyata, and H. Takata. **1989**. Alteration of humus characteristics on the extraction by heating with alkaline solvent. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University* 42:1-6.
- Ziechmann, W. **1988**. Evolution of structural models from considerations of physical and chemical properties. *Humic Substances and Their Role in the Environment*. Eds: F.H. Frimmel and R.F. Christman. John Wiley & Sons Limited.
- Zucconi, F., A. Pera, M. Forte, and M. de Bertoldi. **1981**. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*. 22:54-57.
- Zucconi, F., and M. de Bertoldi. **1987**. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. *Compost: production, quality and use*. Eds.: M. de Bertoldi, M.P. Ferranti, P.L. Hermite and F. Zucconi. Elsevier Applied Science Publishers. Barking.