



# Empleo de técnicas avanzadas y de herramientas quimiométricas para el estudio de residuos y de compost

— Tesis Doctoral de la Universidad Miguel Hernández de Elche —



**GIAAMA**



Grupo de  
Investigación  
Aplicada en  
Agroquímica  
y Medio  
Ambiente  
Universidad  
Miguel  
Hernández

**JULIO MARTÍN MATA**

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA  
DPTO. AGROQUÍMICA Y MEDIO AMBIENTE

**2015**



Empleo de técnicas avanzadas y de herramientas quimiométricas para el estudio de residuos y de compost

---

*Using advanced techniques and chemometric tools for the study of waste fluxes and compost*

Tesis presentada por: Julio Martín Mata

Para optar al título de doctor

Directores: Frutos Carlos Marhuenda Egea

Raúl Moral Herrero

Concepción Paredes Gil

---

Se autoriza la reproducción del contenido de esta tesis, siempre y cuando se cite la fuente.  
Impreso en España / Printed in Spain.

---





**Dr. Ignacio Gómez Lucas**, Director del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “**Empleo de técnicas avanzadas y de herramientas quimiométricas para el estudio de residuos y de compost**”, presentada por **D. Julio Martín Mata**, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

El presente ejemplar ha sido revisado por el profesor que certifica

Fdo. Dr. Ignacio Gómez Lucas  
Profesor Titular de Edafología y Química Agrícola  
Elche, 12 de octubre de 2015



Esta memoria ha sido presentada por D. **Julio Martín Mata**, Licenciado en Ciencias Químicas, para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Fdo. Julio Martín Mata

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por el **Dr. Raúl Moral Herrero**, Catedrático de Universidad, la **Dra. Concepción Paredes Gil**, profesora Titular de Universidad, ambos pertenecientes al Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y por el **Dr. Frutos Carlos Marhuenda Egea**, profesor Titular de Universidad, perteneciente al Departamento de Agroquímica y Bioquímica de la Universidad de Alicante.



Dr. Raúl Moral Herrero

Catedrático de Universidad de  
Edafología y Química Agrícola  
de la Universidad Miguel  
Hernández de Elche

Dra. Concepción Paredes Gil

Profesora Titular de Edafología y  
Química Agrícola de la  
Universidad Miguel Hernández  
de Elche

Dr. Frutos Carlos Marhuenda Egea

Profesor Titular de Agroquímica y Bioquímica de la  
Universidad de Alicante

Elche, 12 de octubre de 2015





Primeramente, quisiera agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Raúl Moral Herrero, la Dra. Concepción Paredes Gil y el Dr. Frutos Carlos Marhuenda Egea el apoyo recibido, su entrega y su profesionalidad.

No puedo olvidar a los compañeros que han trabajado en las investigaciones que dan sentido a este trabajo: Ángel Luis Torres, M<sup>a</sup> Ángeles Bustamante, P. Gomis, A. Pérez-Espinosa, E. Martínez- Sabater, X. Barbero, Javier Morales, C. Lahoz- Ramos, A. Santos, J. Sáez, M. Bernal y, por supuesto, a mis directores que, sin su trabajo, no hubiese sido posible esta tesis.

A mis padres Luis y Marisa, mis hermanos Luis y Pablo, por el apoyo que siempre he recibido de ellos.

A mi esposa Victoria por haberme animado a seguir y conseguir mis metas, por difíciles que hayan sido. A Patricia y Eloy por su comprensión por las largas horas que le he dedicado al estudio.



# ÍNDICE

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1. Residuos orgánicos.....   | 3          |
| 1.2. Naturaleza de lodos de depuradora.....  | 3          |
| 1.2.1. Lodos de depuradora.....  | 3          |
| 1.2.1.1. Producción, tipos y sus características.....  | 3          |
| 1.2.1.2. Gestión y tratamiento.....  | 6          |
| 1.2.1.3. Valorización económica.....   | 7          |
| 1.2.2. Residuos ganaderos.....   | 10         |
| 1.2.2.1. Producción, tipos y sus características.....  | 10         |
| 1.2.2.2. Gestión y tratamiento.....  | 13         |
| 1.2.2.3. Valorización agronómica.....  | 14         |
| 1.3. Compostaje como vía de valorización de residuos orgánicos.....  | 16         |
| 1.3.1. Etapas y factores que influyen en el proceso de compostaje.....   | 17         |
| 1.3.2. Repercusión del proceso en la materia orgánica residual.....  | 18         |
| 1.3.3. Evaluación de la calidad de los compost.....  | 20         |
| 1.4. Técnicas instrumentales avanzadas.....  | 24         |
| 1.4.1. Espectroscopía infrarroja vía FT-IR.....  | 24         |
| 1.4.2. Resonancia magnética nuclear. RMN.....  | 26         |
| 1.4.3. Análisis térmico. TG, DTG y DTA.....  | 27         |
| 1.4.4. Espectroscopía de fluorescencia.....  | 30         |
| 1.5. Técnicas quimiométricas.....  | 33         |
| 1.5.1. Métodos de análisis multivariante.....  | 33         |
| 1.5.1.1. Métodos de reducción de variables de primer orden.....  | 35         |
| 1.5.1.2. Métodos de reducción de variables de segundo orden. Método PARAFAC.....   | 40         |
| 1.5.1.3. Escalado multidimensional y escalado multidimensional no lineal. MDS y NLMDS.....   | 42         |
| 1.5.2. Estado del arte en el uso de técnicas quimiométricas en gestión de residuos.....  | 44         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>49</b>  |
| <b>3. PUBLICACIONES.....</b>   | <b>53</b>  |
| 3.1. Characterization of dissolved organic matter from sewage sludge using 3D-fluorescence spectroscopy and chemometric tools. <i>Communications in Soil Science and Plant Analysis (2015)</i> ..... | 55         |
| 3.2. Use of thermal methods and chemometric tools to optimize the agronomic management of biosolids. <i>Journal of Environmental Management (2015)</i> . En revisión.....                            | 67         |
| 3.3. Chemical, thermal and spectroscopic methods to assess biodegradation of winery-distillery wastes during composting. <i>Plos One, (2015)</i> .....   | 97         |
| 3.4. Sustainable management of pig slurry using different composting scenarios: assessment of the organic matter changes. <i>Science of the Total Environment (2015)</i> . En revisión.....          | 121        |
| <b>4. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....</b>   | <b>165</b> |
| <b>5. CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....</b>   | <b>189</b> |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>193</b> |





## 1. Introducción



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. RESIDUOS ORGÁNICOS**

Debido a la escasez de recursos materiales, la creciente contaminación medioambiental y la cada vez mayor coste económico de los fertilizantes de síntesis, podemos justificar la utilización de residuos orgánicos en la agricultura. Para ello, será necesario el conocimiento profundo de la composición y el estudio de su aplicación en suelos de este tipo de residuos. En este estudio, nos centraremos en los materiales resultados de compostaje (materiales que se encontrarán estabilizados) y en los lodos residuales de depuradoras.

### **1.2. NATURALEZA DE LODOS DE DEPURADORA Y RESIDUOS GANADEROS**

#### **1.2.1. LODOS DE DEPURADORA**

Los lodos de depuradora son residuos urbanos que se originan en la depuración de las aguas residuales urbanas, son un material semisólido, heterogéneo, cuya composición es muy variable y está determinada por las características del agua a tratar, por los procesos de depuración empleados y por el tratamiento a que es sometido.

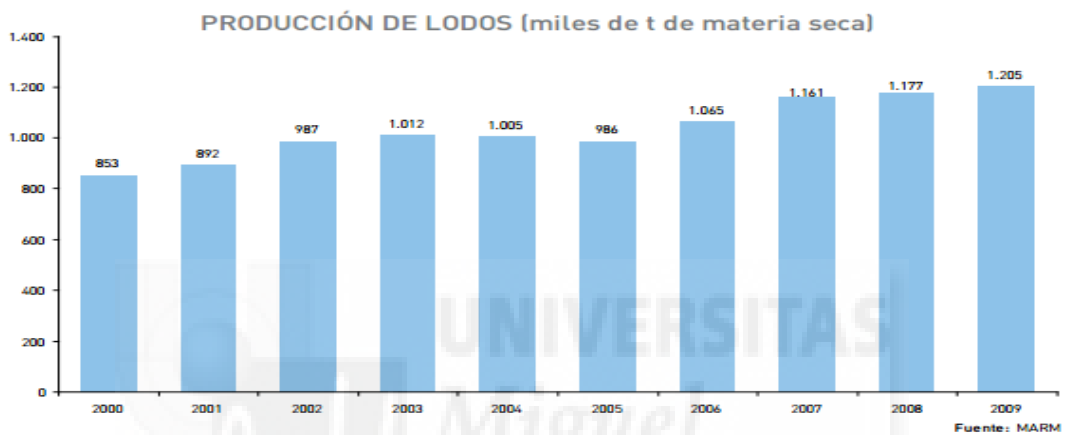
Los lodos generados en los procesos de tratamiento del agua deben ser acondicionados previamente a su disposición definitiva. Los lodos se espesan, para reducir su contenido en agua del 99,5% a un 95%, aproximadamente. Los lodos físico-químicos se decantan por gravedad y los biológicos suelen ir a un espesador por flotación. En todos los tratamientos, se obtienen fangos con un contenido en materia sólida que varía entre un 0,25 y un 12 % en peso.

##### **1.2.1.1.-PRODUCCIÓN, TIPOS Y SUS CARACTERÍSTICAS**

Los lodos poseen una alta capacidad de fermentación y carga de patógenos, debido a su origen, por lo que son tratados para poder manipularlos con mayor facilidad evitando así posteriores apariciones de problemas a la hora de su utilización ó eliminación. Mediante la estabilización

biológica, se consigue la reducción del contenido en materia orgánica del lodo. Si la estabilización es aerobia, la materia orgánica se transforma en CO<sub>2</sub> y si la estabilización es anaerobia, lo hace en gas metano. En algunas EDAR se realiza una inertización de los lodos mediante adición de cal para obtener un pH alcalino, consiguiendo eliminar bacterias.

El tratamiento de los lodos viene marcado por la normativa para su utilización en los cultivos y medio ambiente, en la que se determinan los aspectos sanitarios sobre los seres humanos.



**Figura 1.1.** Evolución de la producción de lodos en el periodo 2000-2009. (Perfil Ambiental de España, 2010).

En la tabla 1.1 que se presenta se encuentran recogidos los valores de diferentes parámetros de lodos procedentes de 82 EDAR del sureste de España, adjuntándose los valores de desviación estándar y el rango de desviación de 337 muestras (Pérez y Moreno, 2008). En el año 2009 se generaron en España 1.205.124 toneladas de lodos procedentes de EDAR. Esto supuso un 2,4 % más que en el año 2008.



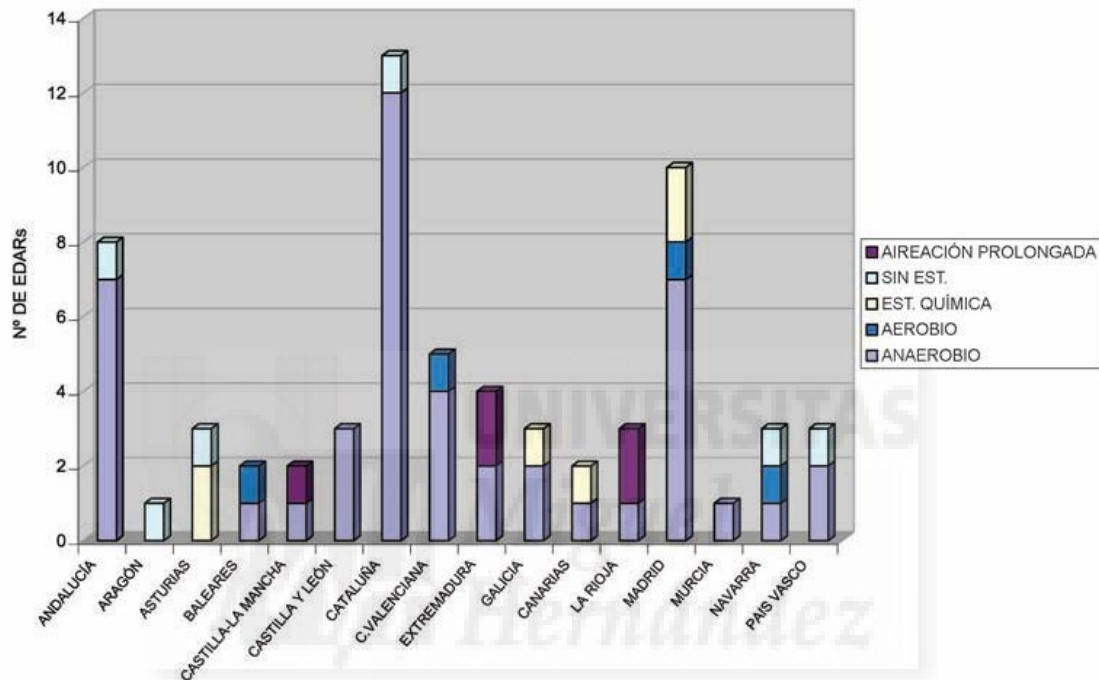
Tabla 1.1. Composición media de los lodos de depuradora del sureste español.

| Parámetro                                | Unidad              | Valor medio <sup>a</sup> | Desviación estándar | Rango de variación |        |
|--|---------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------|
| pH extracto 1:10                         | --                  | 6,54                     | 0,45                | 3,92 -             | 7,73   |
| CE extracto 1:10                         | dS m <sup>-1</sup>  | 2,37                     | 1,75                | 0,50 -             | 12,1   |
| Materia orgánica total                   | %                   | 53,0                     | 10,59               | 14,0 -             | 74,80  |
| Nitrógeno (N)                            | %                   | 4,74                     | 1,42                | 1,16 -             | 8,40   |
| Carbono orgánico total                   | %                   | 33,0                     | 6,12                | 12,0 -             | 46,27  |
| Relación C/N                             | -                   | 5,80                     | 2,33                | 1,90 -             | 20,40  |
| Fósforo (P)                              | %                   | 0,94                     | 0,32                | 0,24 -             | 2,35   |
| Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) | %                   | 2,10                     | 0,74                | 0,19 -             | 5,38   |
| Potasio (K)                              | %                   | 0,33                     | 0,18                | 0,08 -             | 1,27   |
| Potasio (K <sub>2</sub> O)               | %                   | 0,39                     | 0,21                | 0,09 -             | 1,52   |
| Calcio (Ca)                              | %                   | 7,60                     | 3,71                | 1,01 -             | 25,40  |
| Calcio (CaO)                             | %                   | 10,6                     | 5,18                | 1,41 -             | 35,50  |
| Magnesio (Mg)                            | %                   | 0,79                     | 0,65                | 0,01 -             | 5,17   |
| Magnesio (MgO)                           | %                   | 1,30                     | 1,08                | 0,02 -             | 8,58   |
| Sodio (Na)                               | %                   | 0,26                     | 0,39                | 0,02 -             | 4,66   |
| Hierro (Fe)                              | mg kg <sup>-1</sup> | 12914                    | 24068               | 14 -               | 150549 |
| Cobre (Cu)                               | mg kg <sup>-1</sup> | 427                      | 467                 | 26 -               | 4912   |
| Manganeso (Mn)                           | mg kg <sup>-1</sup> | 129                      | 90,7                | 29 -               | 836    |
| Cinc (Zn)                                | mg kg <sup>-1</sup> | 941                      | 1429                | 152 -              | 24634  |
| Cadmio (Cd)                              | mg kg <sup>-1</sup> | 8,12                     | 16,1                | 1,0 -              | 189    |
| Níquel (Ni)                              | mg kg <sup>-1</sup> | 50,5                     | 121                 | 2,0 -              | 1500   |
| Plomo (Pb)                               | mg kg <sup>-1</sup> | 137                      | 109                 | 4,0 -              | 1119   |
| Cromo (Cr)                               | mg kg <sup>-1</sup> | 544                      | 3139                | 2,0 -              | 32662  |
| Mercurio (Hg)                            | mg kg <sup>-1</sup> | 0,92                     | 0,95                | 0,1 -              | 7,0    |

<sup>a</sup> valores sobre materia seca. Fuente: Perez, M.D. y Moreno, J. 2008. Capítulo 21. Residuos urbanos. Casos prácticos. Ed: Compostaje. Moreno, J. y Moral, R. Ed. Mundi-Prensa.

### 1.2.1.2. GESTIÓN Y TRATAMIENTO

En la figura 1.2 se puede ver el tratamiento de lodos en las distintas Comunidades autónomas, donde Cataluña, Madrid y Andalucía son las mayores productoras en correlación con sus mayores poblaciones.



**Figura 1.2.** Tratamiento de lodos en las distintas Comunidades Autónomas (MARM, 2009)

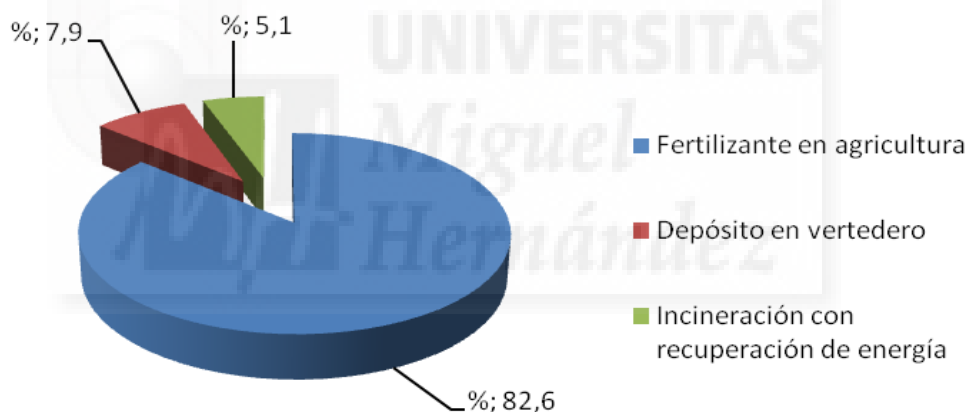
Los lodos generados en los procesos de tratamiento del agua deben ser acondicionados previamente a su disposición definitiva. Para ello se siguen los siguientes procesos:

- **Espesado de lodos:** Se reduce el contenido de agua de un 99,5% a un 95 % aproximadamente. Los lodos físico-químicos se decantan por gravedad y los biológicos por flotación.
- **Estabilización biológica:** Puede ser aerobia ó anaerobia y se consigue la reducción del contenido en materia orgánica del lodo. En la estabilización aerobia, la materia orgánica se transforma en CO<sub>2</sub> mientras que, en la anaerobia, se transforma en gas metano.
- **Inertización:** En algunas EDAR se adiciona lechada de cal en lugar de una estabilización ó digestión para eliminar las bacterias que contienen, sin disminuir el contenido en materia orgánica.

- Acondicionamiento: Se prepara el lodo para su deshidratación, rompiendo la afinidad del agua con el resto de la materia que contiene, por vía química añadiendo un polielectrolito.
- Deshidratación: Se realiza utilizando filtros banda, filtros prensa o centrifugas, reduciendo su volumen y el coste de su transporte.

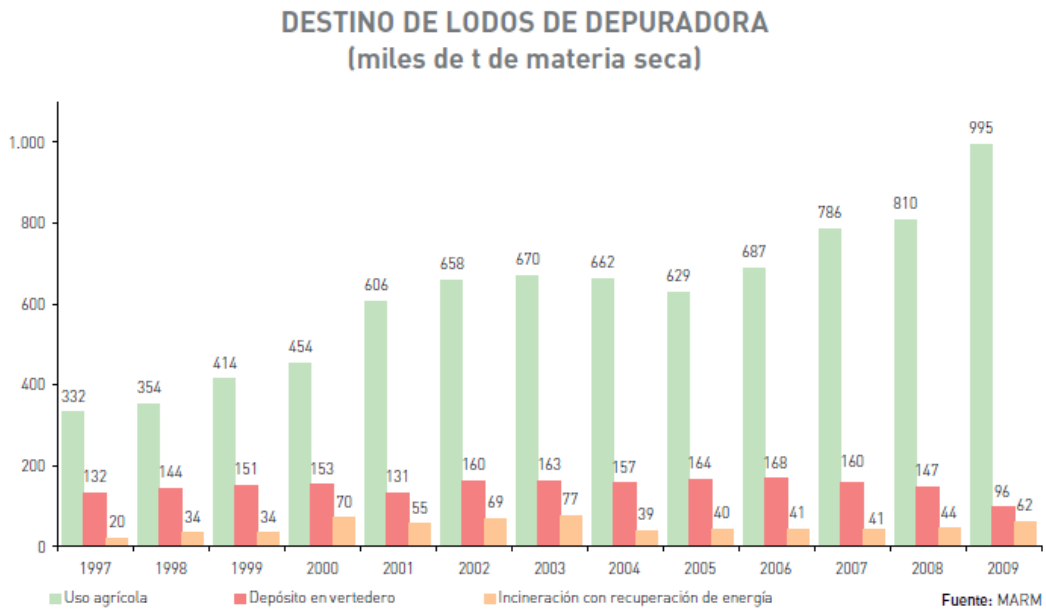
### 1.2.1.3. VALORIZACIÓN AGRONÓMICA

El destino de estos lodos es muy diverso, dependiendo de la localización y población donde se encuentre la EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales). La aplicación a suelos constituye la línea más beneficiosa para el reciclaje de nutrientes y reutilización de la materia orgánica que poseen estos lodos. Su destino se puede ver en la figura 1.3.



**Figura 1.3.** Destinos mayoritarios de los lodos de depuradora (Perfil Ambiental de España, 2010)

En el período 2009-2010 la generación de lodos se incrementó un 41,2 %, siendo la utilización agrícola el único destino que aumentó (119,1%), disminuyendo el resto de destinos.



**Figura 1.4.** Evolución de los destino de lodos de depuradora en el periodo 2000-2009 (Perfil Ambiental de España, 2010).

La utilización de los lodos como fertilizantes órgano- minerales, debido a su alto contenido en materia orgánica (alrededor del 50%) y en macronutrientes (nitrógeno y fósforo especialmente), supone un ahorro en un doble sentido energético:

- Ahorro energético al eliminarlos en suelos
- Ahorro energético en la síntesis de fertilizantes cuyo coste se ha incrementado (Pérez Murcia, 1999).

La utilización de los lodos como acondicionante de suelos mejora sus propiedades físicas, disminuirá su erosión y contribuirá a recuperar zonas de cultivo. Su utilidad como sustrato para plantas ornamentales y hortícolas necesita mejorar las características físicas del lodo, utilizando la técnica de compostaje (Pérez Murcia,1999).

Por tanto, la aplicación de lodos de depuración al suelo como fertilizante o enmienda orgánica, permite el reciclado de nutrientes, especialmente fósforo y nitrógeno, así como de la materia orgánica.

La Directiva 86/278/CEE, de 12 de junio, que se incluyó en la legislación española mediante el RD 1310/1990 (BOE 29/10/1990), relativa a la protección del medioambiente y en particular, de los suelos, en la utilización de lodos de depuradora en agricultura, se permite su utilización cuando la concentración de metales pesados, tanto en los lodos como en los suelos, no superen ciertos límites. Esta Directiva establece para los lodos ciertos requisitos como el proceso de tratamiento, contenido máximo de metales pesados en lodos y suelos, la realización de controles de calidad de lodos y suelos, plazos de aplicación en función del tipo de cultivo y la elaboración de planes de fertilización adecuados que tengan en cuenta la composición de los lodos y las necesidades de los cultivos para el cálculo de la dosis a aplicar.

En el RD se prohíbe la utilización de lodos sin tratar y su aplicación a determinados cultivos y se crea el Registro Nacional de Lodos. También se incluyen los parámetros que deben ser analizados en los lodos como materia seca, materia orgánica, nitrógeno y fósforo o en suelos y lodos como el contenido de metales pesados y el pH.

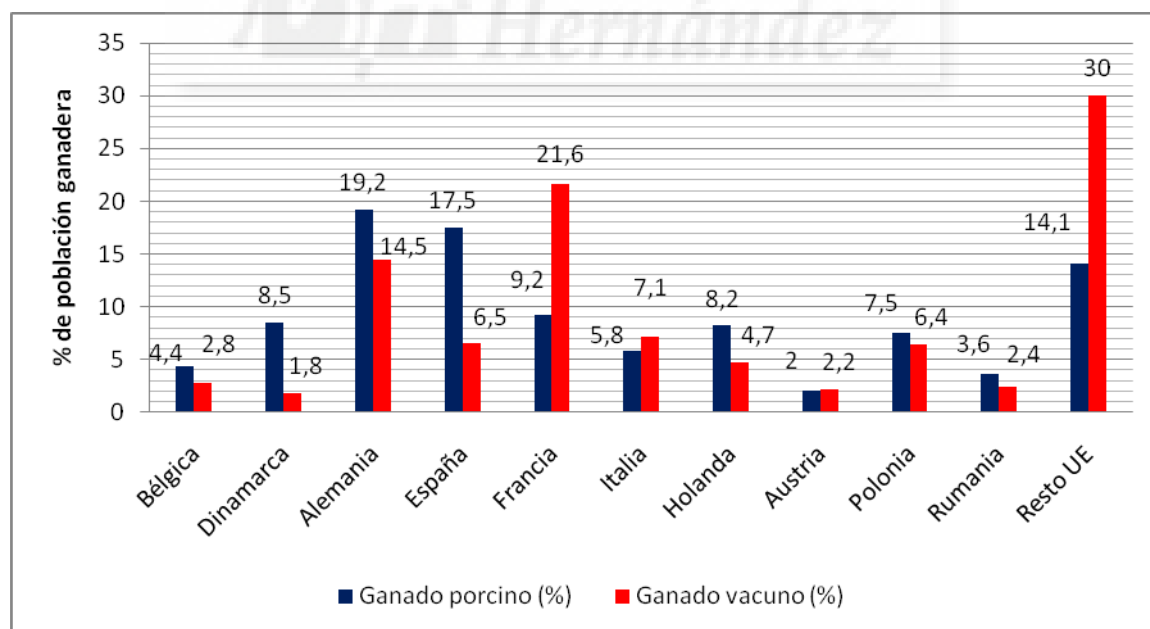
En España se han elaborado planes de lodos de EDAR, que se recogen en el I y II Plan Nacional de Lodos de Depuradoras. En el I Plan Nacional de Lodos de Depuradora 2001-2006 se hace hincapié en la prevención y reducción de contaminación en origen. Para ello, contiene información relativa al tipo de contaminantes que se originan en la industria, como identificarlos y las posibles medidas para su tratamiento. Es un documento dirigido a los ayuntamientos y Comunidades Autónomas. Teniendo en cuenta que una parte importante de los suelos españoles tiene un contenido en materia orgánica bajo (menos del 1% en COT) y que su contenido en metales son bajos, permiten el reciclaje de una gran parte de los lodos generados. Para ello, se realizaron la caracterización de los suelos y se confeccionó un mapa de fósforo, materia orgánica y metales pesados con el fin de remarcar distintas áreas que necesiten de políticas específicas de protección y determinar estrategias de reciclaje de residuos orgánicos como la de los lodos. También se caracterizaron los lodos de depuradoras analizando distintos parámetros como metales pesados, compuestos orgánicos y microbiológicos, así como el estudio de compost de lodos y RSU. Se determinó que estos tienen más nutrientes, y una menor relación C/N, además de un menor contenido en metales pesados que los compost de RSU.

En el II Plan Nacional de Lodos de Depuradoras 2008-2015 se remarca como objetivo de obligado cumplimiento la correcta gestión ambiental de los lodos y su utilización agrícola en determinadas condiciones tecnológicas y ecológicas. Se incluyen otros objetivos para 2015 como la aplicación del 67% de lodos en suelos agrícolas, la valorización del 18% en otros suelos, no superar el 12 % de su depósito en vertederos, no incinerar más del 3% y la correcta gestión ambiental de sus cenizas.

## **1.2.2. RESIDUOS GANADEROS**

### **1.2.2.1. PRODUCCIÓN, TIPOS Y SUS CARACTERÍSTICAS**

En el año 2013 los principales sectores ganaderos en España fueron la ganadería porcina y bovina. Su contribución a la Producción Final Agraria fue del 12,4 % y del 11,9 % respectivamente. En cuanto a la Producción Final Ganadera, representaron un 34,2% el sector porcino y un 32,35 % el vacuno (MARM, 2012).



**Figura 1.5.** Censo de ganado porcino y vacuno, en %, en la UE-28 a diciembre de 2013 (EUROSTAT, 2013)

En España se encuentran censados alrededor de 26 millones de cerdos, lo que supone un 17,5 % del total de estos animales de la UE (estimación de EUROSTAT para 2013). Esto supone que España es el segundo país en cabaña porcina de la UE por detrás de Alemania.

Respecto al sector Bovino, a fecha de 1 de enero de 2014 en España el censo total de vacuno ascendía a 5,8 millones de animales. A lo largo de 2013 España mantuvo el quinto lugar de la UE en cuanto a censo y producción de ganado vacuno (MARM, 2014).

El aumento de la concentración ganadera en el mundo, debido a los sistemas de producción y el efecto de la globalización que han llevado a una especialización y crecimiento de explotaciones ganaderas (Sorensen et al, 2006), ha dado como resultado un aumento de grandes volúmenes de estiércol, especialmente en su forma de purín. La dificultad en su manejo eleva el riesgo de contaminación.

El aumento de las dimensiones de las explotaciones ganaderas unido al volumen de deyecciones (sobre todo de ganado porcino) y la disminución de la superficie útil agraria, hace que se pueda comparar, en cuanto a problemática de gestión de residuos, el sector industrial y ganadero (Danés et al., 1996).

Una definición de residuo puede darse diciendo que es todo material generado por las actividades de consumo y producción que no tiene un valor económico en la forma, lugar y tiempo en el que se ha generado, siendo necesario su recogida y tratamiento para evitar riesgos en la salud y medioambientales, espacios ocupados innecesariamente ó por razones estéticas (Abad, 2002 ; Climent et al., 1996).

La generación mundial de residuos animales se estima teniendo en cuenta los censos de animales y el tipo de manejo. En la UE se estima que la generación de estiércoles, procedentes en su gran mayoría de ganado porcino y vacuno, es de 1500 millones de toneladas (Holm-Nielsen et al., 2009). La proporción de purín (estiércol en forma líquida) varía según el país de que se trate, desde un 20% del total en los países del este hasta un 95 % del total producido en el caso de Holanda (Burton-Turner, 2003). Por lo general en España, Portugal y el centro de Europa, más del 65 % del estiércol se produce en forma de purín en el que la gran mayoría es de

procedencia del ganado porcino (Bernal y Gondar, 2008). Las estimaciones para España son de 140 millones de toneladas al año, donde la mayoría provienen del ganado porcino y vacuno (Holm-Nielsen et al., 2009).

En el Real Decreto 949/2009, de 5 de junio, por el que se establecen las bases reguladoras de las subvenciones estatales para fomentar la aplicación de los procesos técnicos del Plan de biodigestión de purines, se definen los términos de estiércoles y purines como:

- **Estiércol:** Todo excremento u orina de animales de granja, incluidas las aves, con o sin cama, el agua de lavado y los restos de pienso, las aguas para limpieza de las instalaciones de estabulación, de almacenaje de leche y ordeño, en proceso de cambio biológico. En función del sistema de producción tendrán diferentes contenidos de agua, dando lugar a los estiércoles sólidos, semisólidos y líquidos.
- **Purín:** Estiércol líquido con más de un 85 % de humedad.

La composición de los purines estará determinada por el tipo de alimentación y el manejo del lecho o cama del ganado, la comida que no se aprovecha, el agua de bebida, de limpieza y el de lluvia ó escorrentía superficial del área de explotación. Con estos componentes, se puede asegurar que su composición es muy variable. Su peso específico se encuentra entre los 1,01 y los 1,03 Kg·L<sup>-1</sup>. En la tabla 1.2 se muestran las composiciones generales de estiércoles según el tipo de ganado del que provengan (Burton y Turner, 2003).

**Tabla 1.2.** Composición general de estiércoles según el tipo de ganado (g·Kg<sup>-1</sup> sobre peso fresco)

|                                    | Materia seca |           | Nitrógeno total |           | N-amónico |           | Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) |           |
|------------------------------------|--------------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------|--|-----------|
|                                    | media        | intervalo | media           | intervalo | media     | intervalo | media                                    | intervalo |
| <b>Estiércoles líquidos/ Purín</b> |              |           |                 |           |           |           |  |           |
| Vacuno                             | 65           | 15-123    | 3,9             | 2,0-7,7   | 2,3       | 1,0-4,9   | 1,3                                      | 0,2-6,0   |
| Porcino                            | 51           | 15-92     | 4,8             | 1,2-8,2   | 3,5       | 1,9-6,1   | 2,0                                      | 0,3-5,0   |
| Aviar                              | 170          | 10-130    | 11,1            | 2,0-18    | 5,2       | 1,9-7,8   | 8,9                                      | 0,9-15    |
| <b>Estiércoles sólidos</b>         |              |           |                 |           |           |           |  |           |
| Vacuno                             | 223          | 160-430   | 4,8             | 2,0-7,7   | 1,3       | 0,5-2,5   | 3,0                                      | 1,0-3,9   |
| Porcino                            | 238          | 200-300   | 6,8             | 4,0-9,0   | 2,4       | 0,7-6,0   | 6,2                                      | 1,9-9,2   |
| Aviar                              | 406          | 220-550   | 23,6            | 5,1-25    | 10,9      | 3,7-18    | 16,6                                     | 8,0-27    |
| Broilers                           | 603          | 450-850   | 24,5            | 22-40     | 8,0       | 2,0-15    | 18,5                                     | 6,9-25    |



Los estiércoles presentan, de forma general, alto contenido de materia orgánica y minerales, cantidades bajas de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y restos de antibióticos, siendo su actividad biológica muy elevada (Canet et al., 2006). En las explotaciones de ganado porcino, también se encuentra presencia de micronutrientes al suministrarse en su dieta este tipo de sustancias junto a compuestos zoonos. En los purines de ganado porcino es frecuente encontrar cinc, debido al suministro de anti diarreicos en forma de óxidos ó sulfatos de cinc (Pomares y Canet, 2001). El fósforo se encuentra en forma mineral en un 80 % en las deyecciones del ganado porcino y ovino, mientras que en los estiércoles sólidos, en su mayor parte, se encuentra en forma de fósforo orgánico. En cuanto al nitrógeno, el estiércol de ganado vacuno presenta valores más bajos.

#### **1.2.2.2. GESTIÓN Y TRATAMIENTO**

La ganadería intensiva ha llevado a un aumento en cuanto a cabezas de ganado en zonas geográficas relativamente pequeñas. El resultado es la generación de un gran volumen de residuos ganaderos (Ko et al., 2008), y asociado a ella han aparecido problemas medioambientales como la contaminación de suelos, lixiviación de altos contenidos de fósforo y nitrógeno en aguas subterráneas, emisión de gases y olores ó vertidos incontrolados. Esta localización del problema, exigirá una solución específica para cada zona en relación a sus condiciones de producción y ambientales.

Para paliar la problemática que genera la alta producción de residuos, se han planteado distintos tratamientos de estiércoles y purines. Los más utilizados se muestran en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Relación entre procesos y el objetivo que se persigue al tratar los residuos ganaderos.

| Tipo de tratamiento | Proceso seguido                        | Objetivo que se persigue                         |
|---------------------|--|--|
| <b>Químico</b>      | Coagulación- flotación                 | Separar fases                                    |
|                     | Adición de aditivos a piensos y balsas | Modificar las características de las deyecciones |
|                     | Ozonización                            | Oxidación de compuestos orgánicos recalcitrantes |
| <b>Físico</b>       | Centrifugado                           | Separar fases                                    |
|                     | Filtración de membrana                 |  |
|                     | Sedimentación por gravedad             |  |
|                     | Ósmosis inversa                        |  |
|                     | Evaporación y secado                   |  |
|                     | Absorción                              |  |
| <b>Biológico</b>    | Digestión aerobia o anaerobia          | Conversión                                       |
|                     | Nitrificación- desnitrificación        | Transformar especies químicas                    |
|                     | Compostaje                             | Conversión                                       |

Con estos procesos se consigue eliminar parte del nitrógeno y de la materia orgánica por transformación en sustancias gaseosa que no causan problemas medioambientales como CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.

### **1.2.2.3. VALORIZACIÓN AGRONÓMICA**

En el apartado anterior se ha visto que el estiércol y purines de cerdo tienen mayor cantidad de nutrientes que los equivalentes de vacuno, aunque el valor nutricional del estiércol de aves es mayor.

En cuanto al nitrógeno disponible, los estiércoles de vacuno son los que menor cantidad contienen. Se estima que el nitrógeno disponible durante el primer año de estiércoles procedentes de ganado porcino y ovino es de un 40 a 50 %, mientras que para los procedentes de ganado vacuno es de un 20 a 30 %, siendo el que presenta mayor disponibilidad el de procedencia aviar que se estima de un 61 a 66 % (Pomares y Canet, 2001).

La aplicación a suelos de estiércoles ha de realizarse calculando la dosis adecuada para cada tipo de cultivo. Se ha estipulado que la cantidad de nitrógeno añadido no debe superar los 170 Kg·ha<sup>-1</sup>·año<sup>-1</sup> para suelos vulnerables según aparece en la Directiva del Consejo de Europa 91/676/CEE (DOCE, diciembre de 1991).

La adición incontrolada de materia orgánica al suelo, por el efecto de su degradación, puede derivar en condiciones de anoxia y ambiente reductor.

El fósforo se encuentra, en forma mineral, en un 80% en estiércoles procedentes de ganado vacuno y porcino, mientras que para el de origen aviar representa un 60 %. El contenido de fósforo es superior al del nitrógeno presente en los estiércoles. La relación P/N no se encuentra equilibrada para la nutrición de la planta.

La aplicación directa de estiércoles a suelos puede generar problemas debido a que una aplicación abusiva tiene asociado el riesgo de que se acumule nitrógeno y fósforo con el consiguiente riesgo de contaminación de aguas.

La salinización de suelos debe controlarse al aplicarse purines puesto que su conductividad eléctrica es elevada y, por otro lado, el contenido de amoníaco puede traer asociado problemas medio ambientales al volatilizarse y por la posibilidad de contaminación de aguas por lixiviación. También se ha detectado en estos residuos la presencia de metales como el cobre y cinc. El sulfato de cobre se utiliza para regular su crecimiento, mientras que el cinc está presente en fungicidas y desinfectantes de pocilgas (Pomares y Canet, 2001).

Como se ha visto en la anterior sección, existen diferentes procesos de tratamiento de los residuos ganaderos, pero sólo se consigue eliminar parte del nitrógeno y de la materia orgánica en CO<sub>2</sub> y nitrógeno molecular.

La selección del tratamiento a seguir estará asociada con el problema que genera el residuo. La legislación actual hace especial referencia al problema de los nitratos por su solubilidad y la contaminación de aguas subterráneas por parte de estos compuestos. Por ello, los planes de gestión de estos residuos se llevarán a cabo en base al balance de nitrógeno, teniendo además

en cuenta otros factores como la emisión de compuestos orgánicos volátiles, gases, el fósforo como contaminante, metales pesados y el consumo energético del proceso.

Será necesario establecer parámetros de calidad que nos permitan discernir entre los materiales orgánicos con posibilidad de ser utilizados como fertilizantes para los suelos de otros que deban ser clasificados como residuos para no convertir los suelos en vertederos incontrolados de residuos.

### **1.3. COMPOSTAJE COMO VIA DE VALORIZACION DE RESIDUOS ORGÁNICOS**

El compostaje es un proceso de descomposición de la materia orgánica biológica, en condiciones aerobias, llevado a cabo por la actividad metabólica de diversos microorganismos, controlando durante el proceso las condiciones de humedad, temperatura y aireación. El producto final se encuentra después de una fase de estabilización y maduración (Iglesias Jiménez et al., 1991). Los compuestos orgánicos son degradados a sustancias más simples que son utilizadas por los microorganismos. En el proceso, parte de la energía se utiliza en el metabolismo de los microorganismos y parte se libera en forma de calor (Tuomela et al., 2000).

La aplicación a suelos de restos orgánicos debe estar precedida del tratamiento adecuado. En la Unión Europea se generan aproximadamente, 220 millones de residuos de procedencia agroindustrial lo que supone un problema medioambiental (Moreno-Casco y Moral, 2008). El reciclaje de estos residuos supone una vía importante para aliviar su impacto. La utilización de compost como fertilizante ó enmienda orgánica a suelos, puede asemejarse a la efectividad de otros fertilizantes (Paredes et al., 2005).

Podemos resumir las ventajas e inconvenientes del proceso de compostaje (Flotats y Solé, 2008):

- **Ventajas:** Se trata de una tecnología simple, económica y robusta con posibilidad de control del proceso, donde se recupera el 50 % de la masa y sus nutrientes. Se producen sustancias húmicas, nitrógeno de liberación lenta y microorganismos beneficiosos. Se eliminan semillas y organismos patógenos.

- Inconvenientes: Es necesario encontrar y mantener un mercado para el producto. En el proceso se emiten olores y se pierde del 20 al 40 % de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_3$ , y entre el 40 a 60 % de carbono en forma de  $\text{CO}_2$ .

La aplicación de materia orgánica a suelos resulta beneficiosa para sus propiedades químicas, físicas y biológicas (Labrador Moreno, 1996). Así podemos decir:

- Propiedades químicas: Se produce un aumento del contenido de nitrógeno orgánico, carbono y fósforo asimilable por las plantas. Se forman complejos con la arcilla aumentando la capacidad de intercambio catiónico y se favorece la capacidad tampón.
- Propiedades físicas: Se mantiene y estabiliza la estructura del suelo y se mejora la porosidad que permite un aumento de la capacidad de retención y de infiltración de agua.
- Propiedades biológicas: Se aumenta la biomasa microbiana y su actividad, favoreciendo el crecimiento de la masa vegetal que redundará en la capacidad de retención de agua, aumento de infiltración, retención de humedad, etc.

### **1.3.1. ETAPAS Y FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE COMPOSTAJE**

Durante el proceso de compostaje se suceden dos etapas, la biooxidativa y la de maduración o humificación.

En la etapa biooxidativa la actividad microbiana es máxima debido a que existe gran cantidad de compuestos de fácil biodegradabilidad. La mineralización de la materia orgánica es el proceso más importante en esta etapa.

En la etapa de maduración o humificación la actividad de los microorganismos se ralentiza al disponer de menor cantidad de nutrientes, ya que se han descompuesto en la anterior etapa. Aquí, se dan los procesos de humificación que se llevan a cabo mediante reacciones de policondensación, dando como producto un compuesto similar al humus, al que llamamos compost (García et al., 1990).

### 1.3.2. REPERCUSION DEL PROCESO EN LA MATERIA ORGANICA RESIDUAL

La asimilación de la materia orgánica por parte de los microorganismos, va a depender de la capacidad de estos de producir los enzimas necesarios. Para poder crecer, los microorganismos van a necesitar una fuente de carbono, macronutrientes como fósforo y nitrógeno y elementos traza. Parte del carbono, aunque pequeña, la incorporan a sus células y otra parte lo utilizarán como fuente de energía, destinando parte de ella al metabolismo microbiano y el resto se libera en forma de calor (Tuomela et al., 2000). En este proceso los compuestos orgánicos se degradan a moléculas más pequeñas.

El nitrógeno, es un factor limitante en el proceso de compostaje, puesto que, es parte integrante de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas y coenzimas indispensables para el crecimiento celular microbiano. Por tanto, marcará la velocidad del compostaje. Un exceso de nitrógeno, llevará a su pérdida como nitrógeno molecular y amoníaco. El fósforo es también imprescindible para formar compuestos celulares ricos en energía para ser utilizados en el metabolismo celular (Moreno-Casco y Moral, 2008). El proceso sigue distintas etapas, como se ve en la figura 1.6.

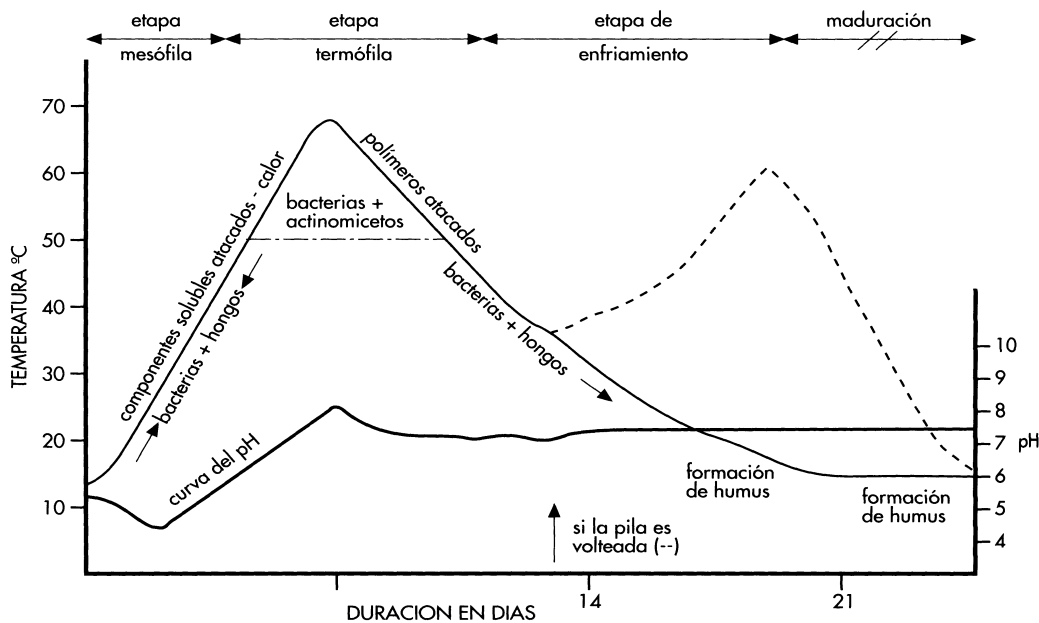


Figura 1.6. Etapas de compostaje aeróbico (Costa et al., 1991)

La temperatura del proceso va a marcar la diversidad de microorganismos en cada etapa. En la etapa mesófila, la temperatura va aumentando debido a la acción de hongos mesófilos y bacterias sobre fuentes de carbono solubles fácilmente degradables. Al superar los 40 °C llegamos a la etapa termófila, en la que las bacterias y hongos termofílicos y actinomicetos degradan las proteínas, lípidos, carbohidratos no celulósicos y hemicelulosa. Se destruyen compuestos fitotóxicos como ácidos grasos, amoníaco, compuestos fenólicos hidrosolubles, etc. En la etapa de enfriamiento, se produce la degradación de compuestos más resistentes (celulosa, lignina y hemicelulosa) que se transforman parcialmente en humus.

Al observar la evolución del pH, el material en la etapa inicial es ácido debido a que se están produciendo ácidos orgánicos, aumentando posteriormente por la descomposición de las proteínas para liberar amonio. El producto final posee un pH ligeramente alcalino debido a la formación de sustancias húmicas, con propiedades amortiguadoras (Moreno-Casco y Moral, 2008).

Estas tres primeras etapas, constituyen la fase biooxidativa que se ha mencionado en el apartado anterior, donde van a predominar reacciones de degradación enzimáticas de moléculas orgánicas.

La última etapa es la de maduración, en la que se dan las reacciones de polimerización y condensación, semejantes a las que se producen en el medio natural en el proceso de humificación, para dar lugar a lo que llamamos compost. En este proceso se genera agua, dióxido de carbono y materia orgánica estabilizada. La estabilidad biológica hace referencia al grado de descomposición de la materia orgánica, determinante para evitar problemas en el sistema suelo-planta. En el proceso de humificación, la materia orgánica debe evolucionar hacia formas resistentes a la biodegradación que permitan aumentar la fertilidad de los suelos donde se aplique.

### **1.3.3. EVALUACION DE LA CALIDAD DE LOS COMPOST**

En la ORDEN APA/863/2008 (BOE, 1 de abril de 2008), en su anexo I se incluyen los requisitos que deben cumplir las enmiendas orgánicas (compost de materiales orgánicos biodegradables donde entran los lodos de EDAR, compost vegetal y compost de estiércol). En la tabla 1.4 se muestran los requisitos para enmiendas orgánicas compostadas pertenecientes al Grupo 6 de la ORDEN APA/863/2008 (Tabla 1.4).

Existen numerosos métodos para poder evaluar la madurez del compost, con distintos grados de dificultad y fiabilidad (Moreno-Casco y Moral, 2008), lo más adecuado, probablemente, sería utilizar una combinación de éstos para realizar una evaluación adecuada del grado de madurez, ya que no existe un método universal.

Si utilizamos criterios basados en propiedades físicas, estos serán de tipo orientativo y podemos evaluar:

- Temperatura: La observación de la evolución de la temperatura durante el proceso de compostaje, puede llevarnos a establecer el final de la etapa biooxidativa. Pero hay que tomar precauciones puesto que, si sobrepasamos los 700 C se puede dar una cierta inactividad microbiana. Se han propuesto diversos test de autocalentamiento para evaluar la madurez del compost, siendo el más empleado el de Dewar.
- Olor: La presencia de ácido acético y compuestos azufrados, dan un olor característico a los residuos orgánicos, desapareciendo con la madurez del compost. El olor a “tierra húmeda”, va a ser significativo del grado de madurez, debido a la emisión de un compuesto, por parte de ciertos microorganismos, denominado geosmina.
- Color: el color oscuro que presenta el compost maduro, se debe a la presencia de melanoidinas y compuestos con dobles enlaces conjugados.



Tabla 1.4. Requisitos para enmiendas orgánicas del Grupo 6. Fuente BOE de 1/4/2008.

| Denominación del Tipo                         | Contenido mínimo en nutrientes (porcentaje en masa)<br>Información sobre la evaluación de los nutrientes<br>Otros requisitos  | Otras informaciones sobre la denominación del tipo o del etiquetado  | Contenido en nutrientes que debe declararse y garantizarse.<br>Formas y solubilidad de los nutrientes.<br>Otros criterios  |
|---|---|--|--|
| <b>Enmienda orgánica compost</b>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materia orgánica total: 35%</li> <li>- Humedad máxima: 40%</li> <li>- C/N &lt; 20</li> </ul> <p>Las piedras y gravas eventualmente presentes de diámetro superior a 5 mm, no superarán el 5%. Las impurezas (metales, vidrios y plásticos) eventualmente presentes de diámetro superior a 2 mm, no superarán el 3%. El 90% de las partículas pasarán por la malla de 25 mm</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH</li> <li>- Conductividad eléctrica</li> <li>- Relación C/N</li> <li>- Humedad mínima y máxima</li> <li>- Materias primas utilizadas</li> <li>- Tratamiento o proceso de elaboración</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materia orgánica total</li> <li>- C orgánico</li> <li>- N total (si supera el 1%)</li> <li>- N orgánico (si supera el 1%)</li> <li>- N amoniacal (si supera el 1%)</li> <li>- P2O5 total (si supera el 1%)</li> <li>- K2O total (si supera el 1%)</li> <li>- Ácidos húmicos</li> <li>- Granulometría</li> </ul> |
| <b>Enmienda orgánica compost vegetal</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materia orgánica total: 40%</li> <li>- Humedad máxima: 40%</li> <li>- C/N &lt; 15</li> </ul> <p>No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH</li> <li>- Conductividad eléctrica</li> <li>- Relación C/N</li> <li>- Humedad mínima y máxima</li> <li>- Tratamiento o proceso de elaboración</li> </ul>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materia orgánica total</li> <li>- C orgánico</li> <li>- N total (si supera el 1%)</li> <li>- N orgánico (si supera el 1%)</li> <li>- N amoniacal (si supera el 1%)</li> <li>- P2O5 total (si supera el 1%)</li> <li>- K2O total (si supera el 1%)</li> <li>- Ácidos húmicos</li> <li>- Granulometría</li> </ul> |
| <b>Enmienda orgánica compost de estiércol</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materia orgánica total: 35%</li> <li>- Humedad máxima: 40%</li> <li>- C/N &lt; 20</li> </ul> <p>No podrá contener impurezas ni inertes de ningún tipo tales como: piedras, gravas, metales, vidrios o plásticos</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH</li> <li>- Conductividad eléctrica</li> <li>- Relación C/N</li> <li>- Humedad mínima y máxima</li> <li>- Tratamiento o proceso de elaboración</li> </ul>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Materia orgánica total</li> <li>- C orgánico</li> <li>- N total (si supera el 1%)</li> <li>- N orgánico (si supera el 1%)</li> <li>- N amoniacal (si supera el 1%)</li> <li>- P2O5 total (si supera el 1%)</li> <li>- K2O total (si supera el 1%)</li> <li>- Ácidos húmicos</li> <li>- Granulometría</li> </ul> |

Podemos utilizar métodos químicos de análisis del grado de madurez como:

- Carbono orgánico soluble (Cw): Se observa una correlación de este parámetro con la absorbancia a 465 nm en los compost y con el índice Cot/Not, pudiéndose estimarse la madurez del compost con la absorbancia a esta longitud de onda de una muestra de extracto acuoso.
- Relación C/N: Debido a la variabilidad de la relación Cot/Not para los distintos compuestos obtenidos en el compostaje, algunos autores proponen el seguimiento de este índice durante el proceso y no tomarlo como índice absoluto para mostrar el grado de madurez. En la fase acuosa se producen las reacciones degradativas de la materia orgánica, disminuyendo la concentración de péptidos, aminoácidos, polisacáridos y ácidos grasos de bajo peso molecular durante el proceso, observándose un aumento de moléculas de mayor peso molecular, lo que lleva asociado una disminución del índice Cot/Not en la fase acuosa. Los valores caen de 30- 40 a valores aproximados a 5-6. El problema se encuentra en la dificultad de determinar el Not en la fase acuosa por su baja concentración.
- Índice  $N-NH_4^+$  /  $N-NO_3^-$  : La presencia de cantidades apreciables de nitratos y/o nitritos se puede considerar como un signo de madurez del compost, ya que, en la fase termofílica, el proceso de nitrificación se encuentra inhibido.
- Capacidad de intercambio catiónico (CIC): Durante el proceso de compostaje, el aumento del número de grupos fenólicos y carboxílicos es un signo del aumento del grado de humificación. Estos grupos son los responsables del aumento del CIC.
- Presencia de compuestos reductores: La presencia de sulfuro de hidrógeno, amoníaco o la medida de un pH ácido, denotan la existencia de procesos anaeróbicos en el proceso, que implican la inmadurez del compost.

Existen métodos microbiológicos como:

- Respirometría: En un compost maduro, la demanda química de oxígeno es, aproximadamente, unas treinta veces menor que en compost sin madurar. El consumo de oxígeno (con producción de dióxido de carbono) es mayor en las primeras etapas del proceso, alcanzando valores cercanos al de un suelo arable en la etapa de maduración. El seguimiento de la emisión de dióxido de carbono se puede llevar a cabo con el test

Solvita<sup>®</sup>, y para obtener la tasa específica de consumo de oxígeno se puede utilizar el test SOUR.

- Actividad de enzimas y del ATP: La concentración de ATP como la actividad de diversas enzimas (catalasa, invertasa, amilasa, deshidrogenasa o fosfatasa alcalina), descienden con la disminución de temperatura a medida que el compost se estabiliza. El inconveniente se encuentra en que estos estudios necesitan de un tiempo largo y en ocasiones, la interpretación de los resultados es complicada.
- Compuestos fácilmente biodegradables: Para determinar el grado de madurez del compost, podemos extraer lípidos utilizando cloroformo (se extraen lípidos más resistentes a la degradación) o dietil éter (los que se degradan más fácilmente). Los extraídos con dietil éter van disminuyendo en el proceso de compostaje, mientras que los extraídos con cloroformo permanecen prácticamente constantes.
- Otro parámetro que podemos utilizar para determinar el grado de madurez, es la relación entre el Cot y el porcentaje de carbohidratos solubles en agua caliente (PHS) (son fácilmente metabolizados). Esto determina el ID (índice de degradabilidad).
- Biomarcadores de la presencia microbiana: Se puede deducir el tipo de microorganismos existentes en determinado momento del proceso de compostaje, utilizando biomarcadores moleculares, lo que nos indicará en que etapa del proceso nos encontramos.

Para estudiar el contenido de materia orgánica humificada, podemos utilizar la relación entre AH (contenido de ácidos húmicos) y el HF (contenido de ácidos fúlvicos). En el proceso se observa una disminución de AF, paralelo al aumento de HF, pudiendo considerar la ratio AH/AF como parámetro para determinar el grado de madures de un compost.

Métodos biológicos para determinar el grado de madurez de un compost pueden ser:

- Siembra sobre sustrato de compost: Se observa la germinación de semillas en un compost (solo o mezclado con suelo) y se compara con una siembra sobre un sustrato control, en condiciones controladas de temperatura y luz.
- Índice de germinación (IG): Se comparan la germinación y longitud de raíces (normalmente de semillas de berro) en extractos de compost con las obtenidas en agua destilada. Esto determina el IG, donde si su valor es mayor al 80 % indica que el compost no presenta fitotoxicidad.

- Crecimiento de plantas en tiestos: Se realiza en tiestos que contienen compost mezclado con suelo, turba ó sustratos comerciales, en condiciones controladas, determinándose el peso fresco y seco de plantas cultivadas en ellos. Estos ensayos son lentos e instalaciones complejas.

## **1.4. TÉCNICAS INSTRUMENTALES AVANZADAS**

### **1.4.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA MEDIANTE TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)**

En esta técnica, la absorción energética se debe a movimientos de vibración y rotación de los enlaces y grupos en la molécula, pudiendo clasificar la resonancia vibracional en dos grupos:

- Stretching: la distancia de enlace varía mediante alargamiento o estrechamiento.
- Bending: la disposición de los átomos varía en relación al eje de enlace.

Los espectros infrarrojos, se obtienen irradiando la muestra con longitud de onda en intervalos que se corresponden con valores entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . La energía transmitida llega al registro y se procesa el porcentaje de energía transmitida (transmitancia) en un periodo de tiempo de entre 5 a 20 min aproximadamente, obteniendo una curva de transmitancia frente a longitud de onda o frecuencia (Stevenson, 1994), produciendo un pico donde haya existido una absorción molecular por el efecto de resonancia.

Los espectrofotómetros con transformada de Fourier (FT-IR), basados en el fundamento del interferómetro de Michelson, utilizan la transformada de Fourier para transformar la señal al dominio de frecuencias en lugar de tiempos.

La espectroscopía FT-IR caracteriza de forma cualitativa y no destructiva los grupos químicos principales que forman la materia orgánica (Inbar et al., 1990, Smidt et al., 2002). Presenta ventajas frente a técnicas espectroscópicas más sofisticadas puesto que la preparación de las muestras es sencilla y su coste no es muy elevado, además, no hay que realizar un tratamiento

químico previo de las muestras y todos los componentes que encontramos en las mismas, son analizados simultáneamente, lo que lleva asociado una simplicidad en el análisis. Las sustancias presentes en la materia orgánica de compost contienen una serie de bandas características de las moléculas que la componen (Stevenson, 1994), como se puede ver en la tabla 1.5.

**Tabla 1.5.** Bandas de absorción principales en IR para sustancias húmicas.

| Frecuencia (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo asignado   |
|--------------------------------|--|
| 3400-3300                      | Vibración O-H, vibración N-H   |
| 2940-2900                      | Vibración C-H alifático  |
| 1725-1720                      | Vibración C=O de grupos carboxílicos y cetonas   |
| 1660-1630                      | Vibración C=O de grupos amida primaria, quinonas y/o cetonas   |
| 1620-1600                      | C=C aromático y C=O de cetonas conjugadas  |
| 1590-1517                      | Vibración simétrica COO-, deformación N-H más vibración C=N de banda de amidas secundarias   |
| 1460-1450                      | C-H alifático  |
| 1400-1390                      | Deformación O-H y vibración C-O de OH fenólico, deformación C-H de grupos CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> , vibración antisimétrica COO- |
| 1384                           | Banda de nitrato   |
| 1280-1200                      | Vibración C-O y deformación O-H de grupos carboxílicos, vibración C-O de éteres arílicos   |
| 1170-950                       | Vibración C-O de polisacáridos o sustancias tipo polisacárido, Si-O de impurezas de silicatos  |

La importancia de la espectroscopía IR estriba en que proporciona información esencial sobre la naturaleza de los grupos presentes en la molécula, la disposición de aquellos que contienen oxígeno y su reactividad, se detectan proteínas y carbohidratos y la presencia de impurezas de tipo inorgánico como iones metálicas y arcillas, siendo una técnica idónea para realizar un análisis cuantitativo.

Con esta técnica, podremos obtener información sobre la transformación y maduración en un proceso de compostaje de la materia orgánica, siendo válida para establecer algunos parámetros para estimar el grado de madurez del compost (Marhuenda- Egea et al., 2007).

### **1.4.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ALTO CAMPO (RMN)**

Esta técnica espectroscópica, proporciona información directa de la estructura y conformación de compuestos orgánicos (Wilson, 1987). La ventaja que representa esta técnica al trabajar con muestras de compost, se debe a que la presencia de impurezas de carácter paramagnético es baja y el contenido de materia orgánica elevado. Los núcleos más estudiados con RMN son los de C e H, aunque también existen estudios con el P (Wilson, 1987). También se ha utilizado la RMN para estudiar la composición, transformación y degradación de sustancias húmicas (Conte et al., 2004; Cook, 2004).

La carga que contienen los núcleos, como los de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , al girar, crean un campo magnético a lo largo de su eje nuclear. Si estos núcleos se encuentran bajo la influencia de un campo magnético externo de intensidad  $B_0$ , realizarán un movimiento de precesión alrededor del eje de este campo. Si "l" es el número cuántico de spin, nos va a determinar el número de orientaciones posibles de un núcleo en el campo magnético externo, según  $2l+1$ . Tanto para  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  como para  $^{31}\text{P}$  el valor de l es de  $\frac{1}{2}$ , lo que lleva a tener dos orientaciones posibles, una paralela y otra antiparalela al campo  $B_0$  ( $l=+1/2$  y  $l=-1/2$ ).

La espectroscopia RMN se basa en que, entre las dos orientaciones existe una diferencia de poblaciones, que al aplicar una perturbación, cambian. Esta perturbación se consigue al aplicar sobre las muestras una radiación electromagnética en un corto espacio de tiempo en el que, su campo magnético asociado,  $B_1$ , interaccionará con los núcleos al absorber energía cuando la frecuencia de esta radiación resuene con la de precesión. Al volver al equilibrio, se obtiene una señal que se procesa. La relación entre la frecuencia de resonancia y el campo magnético externo, viene dada por la ecuación

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

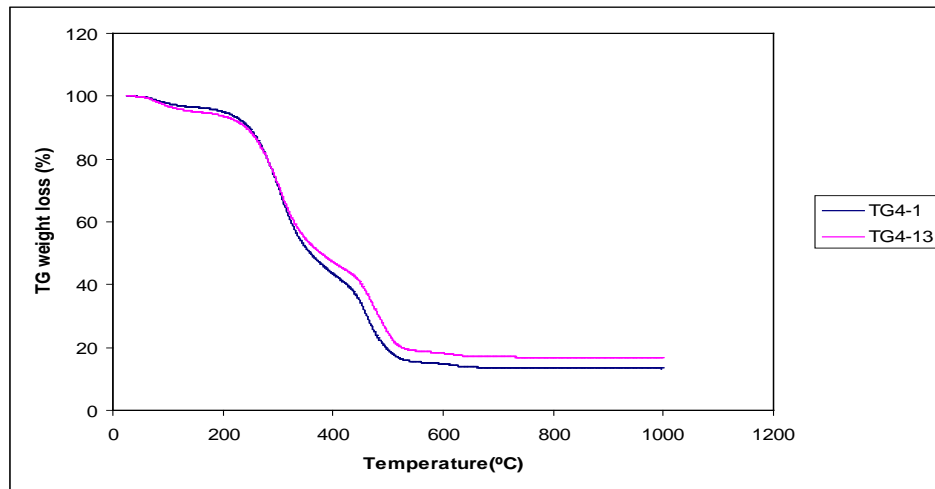
Donde  $\gamma$  se denomina razón giromagnética, y es particular para cada núcleo.

Los espectros RMN para disoluciones acuosas, proporcionan señales estrechas y resueltas, pero en un sólido, se obtienen señales anchas. Este ensanchamiento de las señales se debe a interacciones denominadas anisótropas (Painter et al., 2002). Una de ellas es el acoplamiento dipolar heteronuclear, que puede ser eliminada por irradiación de los núcleos de los protones. Las denominadas acoplamiento dipolar homonuclear y la anisotropía de desplazamiento químico, pueden ser eliminadas haciendo girar la muestra lo suficientemente rápido alrededor de un eje que forma un ángulo de  $54.74^\circ$  con la dirección de  $B_0$ . Es el llamado MAS (magic angle spinning). Al combinar el MAS con un método de transferencia de polarización denominado "polarización cruzada" CP (cross polarization) nos permitirá obtener espectros de  $^{13}\text{C}$  de alta resolución. La CP permite el aumento de la polarización de átomos con una constante giromagnética, y, pequeña como es el caso del átomo de  $^{13}\text{C}$ . Para ello, se perturba el átomo más abundante,  $^1\text{H}$ , transfiriendo la magnetización al núcleo de  $^{13}\text{C}$  en menor proporción (1% aproximadamente) (Conte et al., 2004). Una vez obtenida la señal, se aplica la transformada de Fourier junto a otros ajustes, para aumentar la relación señal-ruido. La información que proporciona la RMN de sólidos es de gran utilidad para poder evaluar la calidad y el grado de madurez de los composts.

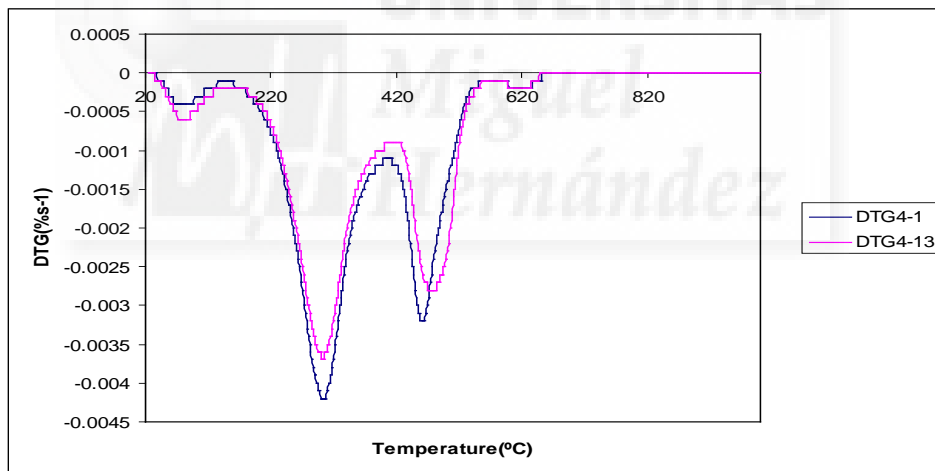
### **1.4.3. ANÁLISIS TÉRMICO (TG, DTG Y DTA)**

Tanto el análisis termogravimétrico (TG), como la termogravimetría derivativa (DTG) como el análisis térmico diferencial (DTA), se basan en el calentamiento y combustión programados de las muestras que se someten a estudio, en atmósfera controlada, para obtener información, tanto cualitativa como cuantitativa, de su contenido orgánico (Melis Castaldi, 2004). El análisis conjunto de TG, DTG y DTA nos aportará información sobre la estabilidad de los compuestos orgánicos en las muestras.

Una de las ventajas de utilizar estos métodos de análisis se encuentra en que el pretratamiento de las muestras es mínimo (secado y triturado). Podemos utilizar estas técnicas para seguir los cambios que se dan en un proceso, como el de compostaje, por medio de curvas termogravimétricas tomadas en diferentes momentos del proceso, como se muestra en las siguientes figuras (Marhuenda- Egea et al., 2007)



**Figura 1.7.** Curva TG de muestras tomadas en diferentes momentos del proceso de compostaje de una pila formada por una mezcla de orujo desalcoholizado y gallinaza. (Marhuenda- Egea et al., 2007).



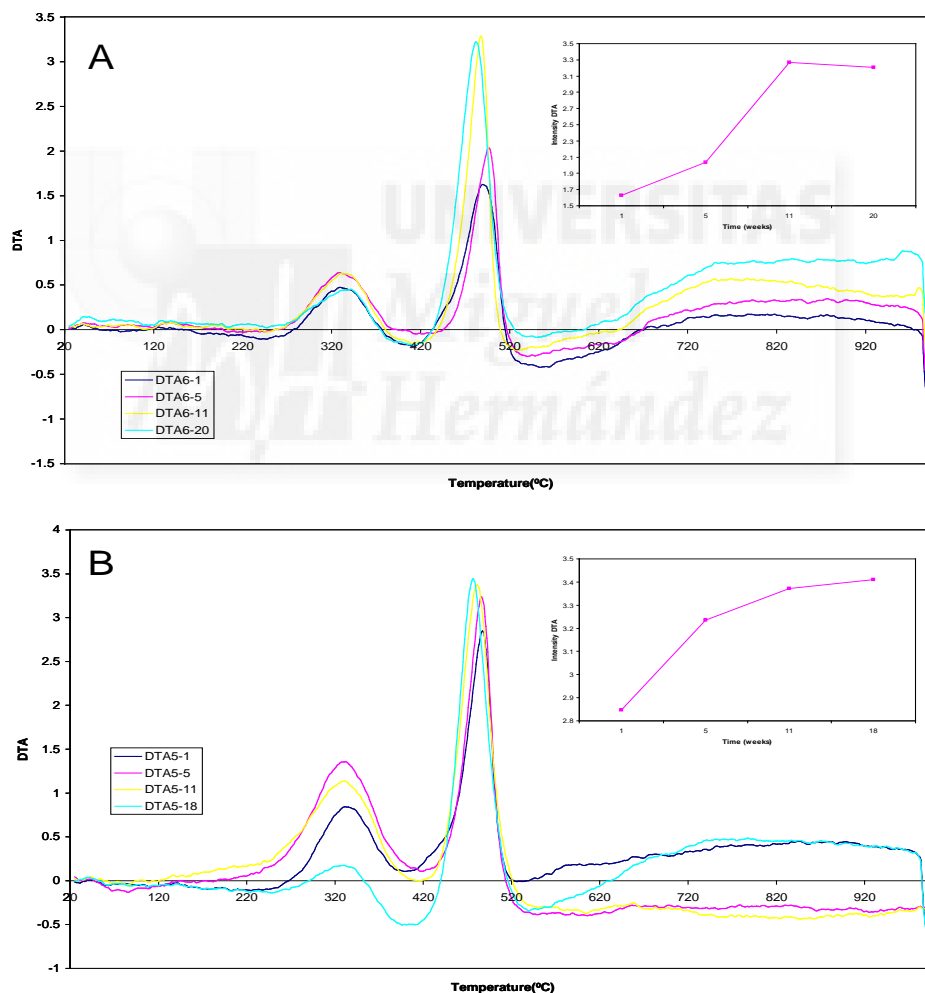
**Figura 1.8.** Curva DTG de muestras tomadas en diferentes momentos del proceso de compostaje de una pila formada por una mezcla de orujo desalcoholizado y gallinaza. (Marhuenda- Egea et al., 2007).

TG explica la pérdida de masa en una muestra con respecto a la temperatura que alcanza el analizador, mientras que DTG representa la primera derivada de los valores de TG, mostrando la velocidad con que se pierde la masa de la muestra en función de la temperatura que alcanza. La pérdida de masa de la muestra que se asocia con el pico exotérmico entre 180 a 410 °C hace



referencia a los materiales celulósicos, mientras que las moléculas más complejas (lignina y material humificado) se asocian al segundo pico exotérmico entre 410 a 600 °C (Baffi et al., 2007). Un parámetro utilizado para evaluar el grado de madurez de una muestra se encuentra relacionando la pérdida de masa del material más estabilizado en relación al menos estable, térmicamente, denominado parámetro R1 (Moldini et al., 2003).

Las curvas de DTA muestran el calor de combustión de la muestra, calculada como el área comprendida entre la línea base y el pico de combustión, utilizando la curva de calibración obtenida para la entalpía de fusión de diferentes metales.



**Figura 1.9.** Curvas DTA de muestras tomadas en diferentes momentos en procesos de compostaje: A) pila formada por mezcla de orujo desalcoholizado y estiércol de vacuno; B) pila formada por mezcla de orujo desalcoholizado y gallinaza. (Marhuenda-Egea et al., 2007).

En la figura 1.9B, la disminución del primer pico, ligado a carbohidratos y estructuras alifáticas, indica el consumo y degradación de estas sustancias a lo largo del proceso. El segundo pico sufre un incremento, que se asocia a estructuras más estables, bien por un aumento de su concentración, o bien por neosíntesis de moléculas más estables. La pérdida de masa de la muestra que se asocia con el pico exotérmico entre 180 a 410 °C hace referencia a los materiales celulósicos, mientras que las moléculas más complejas (lignina y material humificado) se asocian al segundo pico exotérmico entre 410 a 600 °C (Baffi et al., 2007).

#### **1.4.4. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

La espectroscopia de fluorescencia, puede aportar información sobre la materia orgánica soluble a nivel estructural y funcional y relacionar esta información con el grado de humificación de la misma (Bertocini et al., 2005). Se ha utilizado en la caracterización de estos materiales en procesos de compostaje y evaluación del compost (Marhuenda Egea et al., 2007) o en el medio natural acuáticos y terrestres (Senesi et al., 1991).

Es una técnica que requiere pequeñas cantidades de muestra acuosa a baja concentración y con una sensibilidad elevada, en comparación con otras técnicas.

Se basa en la emisión de energía, en forma de luz, de electrones desde un estado excitado al fundamental. En esta técnica, entran en juego tanto los niveles energéticos electrónicos, como los vibracionales de los átomos en las moléculas. Los electrones pueden ser excitados hasta niveles electrónicos próximos, pero se pueden encontrar en niveles vibracionales diferentes. Al volver al nivel vibracional más bajo dentro del nivel electrónico de excitación, la molécula emite energía. Desde este nivel energético, la molécula podrá volver a cualquier nivel vibracional del estado fundamental, emitiendo energía que se denomina fluorescencia. Esto se muestra en la figura 1.10.

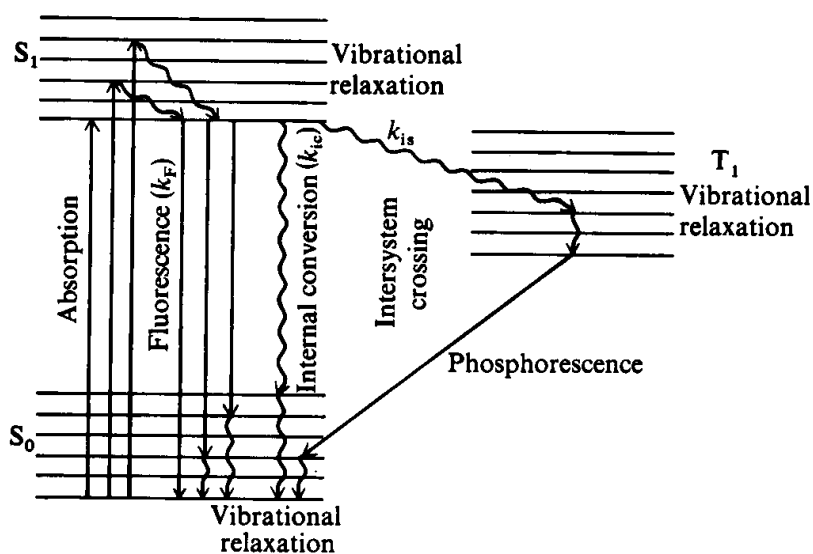


Figura 1.10. Procesos fotoquímicos (Sharma y Schulman, 1999)

Se muestra como una técnica útil para detectar grupos cromóforos con gran cantidad de electrones en orbitales  $\pi$ , como sistemas alifáticos con deslocalización electrónica debido a efectos de resonancia en la molécula y/o sistemas que presenten insaturaciones conjugadas aromáticas. Las moléculas que poseen átomos de oxígeno o nitrógeno con pares de electrones no enlazantes, también emiten fluorescencia.

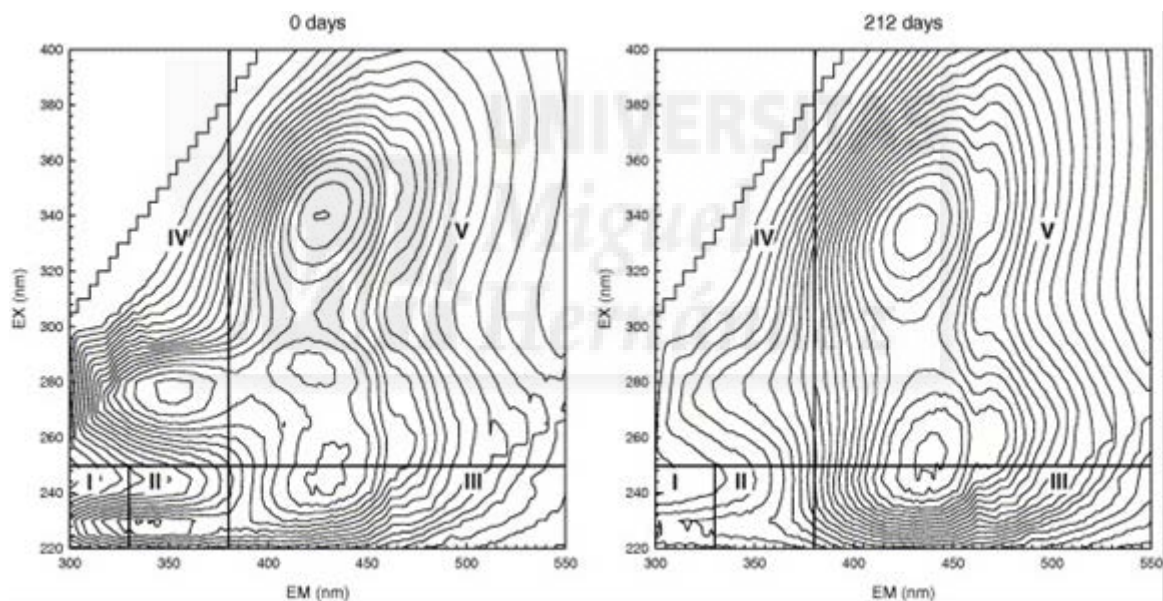
Podemos clasificar las sustancias que poseen grupos cromóforas de dos tipos (Baker, 2002):

- Moléculas orgánicas de peso molecular alto que contienen anillos aromáticos con presencia de grupos carboxílicos y estructuras conjugadas y aromáticas policondensadas, que pueden denominarse como sustancias de tipo húmico y fúlvico.
- Proteínas y péptidos con aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano).

#### Excitation-Emission Matrix (EEM)

Mientras en un espectro de emisión convencional se mide la intensidad de la luz que llega al monocromador a varias longitudes de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ), donde la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) se mantiene constante, en un espectro de excitación se hace un barrido de excitación, manteniendo constante la de emisión. Los tiempos, con los instrumentos actuales,

para obtener los datos espectrales de fluorescencia (menos de 10 min) tanto de emisión como de excitación, permiten obtener matrices excitación-emisión de estos datos (Baker, 2002). Así, podemos tener mapas de contorno para, por ejemplo, a una determinada  $\lambda_{ex}$  determinar las diferentes  $\lambda_{em}$  para los distintos grupos cromóforos en una muestra (Sierra et al., 2005), pudiendo ser utilizado para identificar las distintas especies fluorescentes en mezclas complejas (Coble, 1996). Los espectros EEM presentan gran complejidad y, por tanto, dificultad para identificar los compuestos en una muestra de materia orgánica soluble, habiendo encontrado en la literatura los denominados comúnmente grupos fluoróforos de tipo húmico, fúlvico y proteico (tipo tirosina y triptófano), que se han llamado así porque sus picos aparecen en el lugar donde se encuentran para las muestras estándar de estas sustancias. Ejemplos de espectros de fluorescencia EEM se muestra en la figura 11.



**Figura 1.11.** Espectros de fluorescencia de muestras obtenidas en distintos momentos de un proceso de compostaje.

La intensidad de un pico puede variar con respecto a otro, debido al distinto origen de la materia orgánica y, un cambio en la intensidad total del espectro, reflejará variaciones en la concentración (Baker, 2002). Una baja intensidad de fluorescencia puede asociarse a la presencia de moléculas de bajo peso molecular y bajo grado de policondensación aromática, pudiendo relacionarse con una mineralización de la materia. El aumento de la intensidad de

fluorescencia, puede deberse a la presencia de estructuras aromáticas y enlaces dobles y triples conjugados (Antizar- Ladislao et al., 2006). El espectro EEM nos proporciona una “huella dactilar” de la materia orgánica analizada en distintos momentos de un proceso de compostaje, dando información del grado de madurez del compost (Sierra et al., 2005).

## **1.5. TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS**

Se puede definir la Quimiometría como la disciplina de la Química que utiliza la Matemática, la Estadística y la Lógica Formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos u obtener conocimiento de sistemas químicos. Es una disciplina interdisciplinar, pudiendo considerarla como una rama de la Química Analítica y la Estadística aplicada. Debido a la necesaria utilización de un gran número de datos. Aunque las diversas ramas de la Estadística aplicada se desarrollaron en el primer tercio del siglo XX, la Quimiometría se inicia en la década de los años 70, siendo con el desarrollo de las técnicas analíticas y computacionales, alrededor de los años 90, cuando adquiere un gran impulso.

### **1.5.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS MULTIVARIANTE**

El análisis multivariante es la parte de la estadística y del análisis de datos que estudia, analiza, representa e interpreta los datos que resultan de observar, sobre una muestra de individuos, más de una variable, que son homogéneas y correlacionadas, sin que alguna predomine sobre las demás. La información es de carácter multidimensional, por lo que, la geometría, el cálculo matricial y las distribuciones multivariante son fundamentales (Cuadras, 2014).

La información multivariante es una matriz, pero en el análisis multivariante la información puede consistir en matrices de distancias, que miden el grado de discrepancia entre los individuos (Cuadras, 2014).

En función de la dimensión de los datos disponibles, Booksh y Kowalski (Booksh, 1994) clasifican los datos como:

a) Datos univariantes

-Datos escalares. Instrumentos de orden cero.

Son medidas en las que obtenemos un escalar. El método matemático utilizado es la estadística univariante y la regresión lineal univariante. En la aplicación de estos métodos, obtendremos una respuesta sin ruido de fondo en la señal instrumental, puesto que, antes de proceder al análisis se deben separar los interferentes. No es posible el análisis simultáneo de distintos compuestos en las muestras.

b) Datos multivariantes

-Datos vectoriales. Instrumentos de primer orden.

En estos casos el instrumento de medida proporciona un vector de datos al analizar la muestra, como es el caso de un espectro. Los métodos matemáticos utilizados son los que derivan del análisis multivariante y de la estadística multivariante. En estos casos no es necesario modelar el ruido de fondo previamente ya que, estos métodos permiten detectar las interferencias y el ruido de fondo, que podrán eliminarse con tratamientos previos. La derivación y el centrado, corregirán la línea base del método que estamos utilizando. La no linealidad de los datos de entrada, se corregirán utilizando métodos no lineales adecuados.

-Matriz de datos. Instrumentos de segundo orden.

En estos casos se obtiene una matriz de datos. Tendremos dos tipos de medidas en las filas y las columnas. Se pueden realizar medidas de muestras aunque exista algún compuesto que no se encuentre en la calibración.

El tratamiento de datos de segundo orden se puede llevar a cabo de manera similar a los de primer orden, sólo será necesario desdoblar los datos para obtener, para cada muestra, un tensor de primer orden, pero se mezclará la información. Si mantenemos la estructura tridimensional de los datos, se mantendrá toda la información extraída.

Datos de orden superior. Instrumentos de orden superior.

En estos casos no hay límite en el máximo orden de los datos obtenidos. La ventaja de utilizar estos instrumentos, es el aumento de la sensibilidad. Se pueden aplicar los métodos de análisis denominados de N-vías.

En esta tesis sólo se utilizarán datos multivariantes, por lo que, describiremos los métodos multivariantes que hemos utilizado en los trabajos que la componen.

### **1.5.1.1. MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DATOS DE PRIMER ORDEN BASADOS EN LA REDUCCIÓN DE VARIABLES**

Aplicar el método de reducción de variables se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, se realiza una reducción de variables mediante un PCA (análisis en componentes principales) y en una segunda, se realiza la regresión de estos componentes sobre la matriz de parámetros a estimar.

#### **Análisis en componentes principales (PCA)**

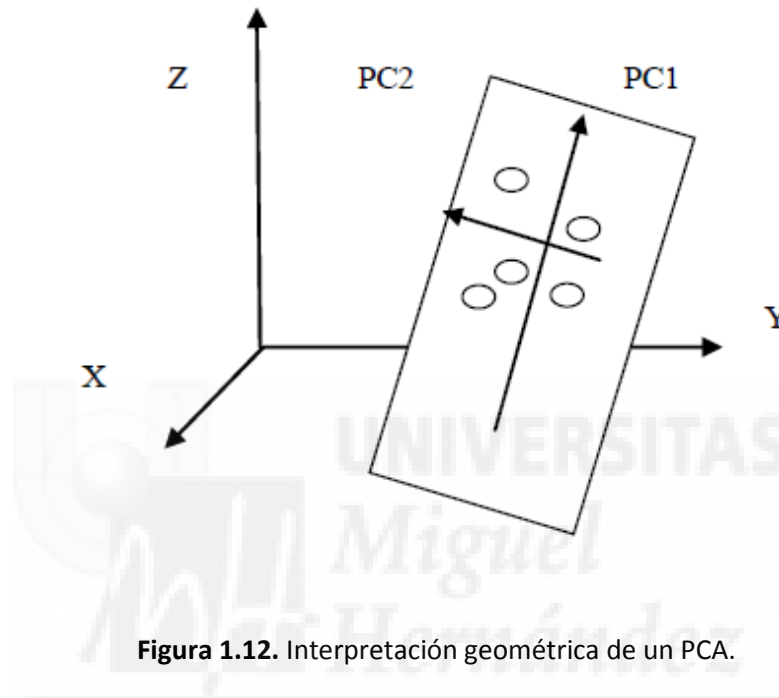
Entre las finalidades de aplicar el método PCA en química, destacan la clasificación de muestras y la reducción de las dimensiones de los datos y, como se ha señalado, es el paso previo de muchos métodos de análisis multivariante.

Esta técnica transforma un número elevado de variables, más o menos correlacionadas, en un menor número de variables no correlacionadas (ortogonales), pero que contienen toda la información del sistema, eliminando la información redundante o reduciendo el ruido de fondo (Ward et al., 2003).

Se parte de una matriz de datos  $X$ , en la que cada filase corresponde con una muestra y cada columna con una variable, que puede ser la absorbancia a una longitud de onda y tiempo determinado. La dimensión de esta matriz, si se han registrado datos para  $m$  muestras y  $k$  variables, será  $m \times k$ .

Geoméricamente podemos decir que el método PCA consiste en un cambio en la dirección y dimensionalidad de los ejes, buscando las direcciones ortogonales que explican la máxima variabilidad de las muestras, para utilizarlas como nuevos ejes de coordenadas a los que llamaremos componentes principales (PCs) (Figura 1.12). El primer PC explica la máxima

variabilidad, el segundo se toma de forma que es perpendicular al primero y explicará la máxima variabilidad una vez extraída la que explica el primero y así sucesivamente. Se definen los loadings (cosenos de los ángulos que forman con los ejes anteriores) para definir los nuevos ejes y, los scores representan las coordenadas de las muestras en los nuevos ejes.



**Figura 1.12.** Interpretación geométrica de un PCA.

Matemáticamente, la matriz  $X$  la descomponemos en una matriz  $T$  de scores y una matriz  $P$  de loadings mas una matriz que denominamos  $E$  de residuales de  $X$ , pudiendo establecer la relación entre ellas:

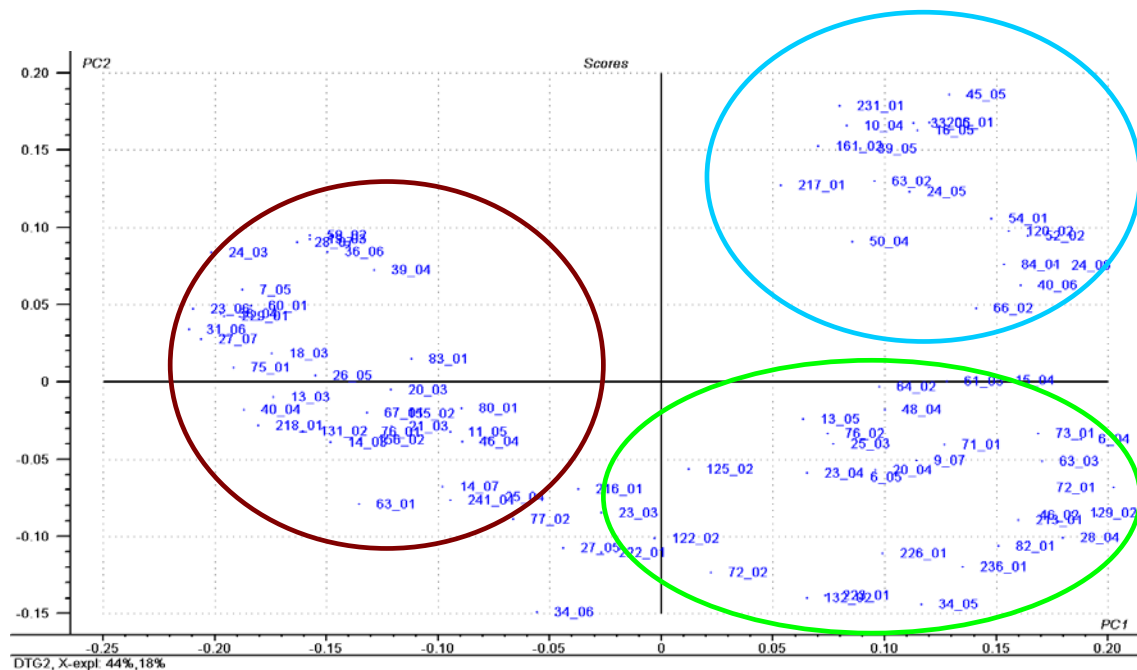
$$X = TP^T + E$$

Para tener una reproducción de la matriz  $X$ , necesitaremos  $k$  vectores de loadings y scores, pudiendo representar la matriz original con un número  $a$  de vectores menor que  $k$ .

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_a p_a^T + E$$

Estos  $a$  parámetros, van a contener la información relevante del sistema. Podemos decir que el conjunto de datos representado por la matriz  $X$ , estaba compuesto de variables correlacionadas, ahora lo hemos definido por un nuevo conjunto de variables, que denominamos PCA, no correlacionadas entre sí, en un sistema de ejes ortogonales nuevo.





**Figura 1.14.** Representación de scores del PCA1 y PCA2 para distintas muestras de lodos de depuradoras.

### **Regresión en componentes principales (PCR)**

El método PCR (Principal Component Regression) utiliza los PCA encontrados y lleva a cabo una regresión múltiple inversa (ILS) de la propiedad a determinar sobre los scores y no sobre los datos originales para evitar problemas en la inversión de la matriz de datos  $(X^T X)^{-1}$ .

Para un proceso en el que se estudian los espectros de  $m$  muestras en la que cada una tiene  $p$  especies absorbentes, obtendremos, para  $k$  longitudes de onda,  $k$  variables independientes para cada muestra. Esto nos llevará a representar cada muestra con un vector  $y$ , en el que se encuentren los valores de la variable a estudiar  $y_1, y_2, \dots, y_p$ , y un vector  $x$ , para los valores espectrales  $x_1, x_2, \dots, x_k$ . Así, para los  $m$  objetos, podremos tener dos matrices, la matriz  $Y$  contendrá las propiedades a determinar de las muestras, de dimensiones  $m \times p$ , y la matriz  $X$  que contendrá los valores espectrales de cada muestra, de dimensiones  $m \times k$ .

En un primer paso, se descompone la matriz X en sus PCA, pudiéndose representar por su matriz T de scores y su matriz de loadings P

$$T = XP$$

El siguiente paso es calcular la matriz Y según

$$Y = T\hat{B} + E$$

Donde  $\hat{B}$  es la matriz de regresores que se obtiene por mínimos cuadrados conociendo los valores de Y de la calibración.

$$\hat{B} = (T^T T)^{-1} T^T Y$$

### **Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) e iPLS**

El método PLS (Partial Least-Squares Regression) fue descrito por Wold en 1975 (Wold, H., 1975). Se diferencia del método PCR en que intenta que los primeros componentes contengan la máxima información para la obtención de la matriz Y. Obtiene unas variables auxiliares llamadas variables latentes, que tienen un gran parecido a los componentes principales hallados con PCR. Cada una de las matrices, se descompone simultáneamente en una suma de a factores

$$X = TP^T + E = \sum_{i=1}^a t_i p_i^T + E$$
$$Y = UQ^T + F = \sum_{i=1}^a u_i q_i^T + F$$

T representa la matriz de scores, P la de loadings y E la matriz de residuos para X (matriz de datos). U representa la matriz de scores, Q la de loadings y F la de residuos para la matriz Y (matriz de la propiedad a determinar). Si tenemos  $m$  muestras,  $a$  factores,  $k$  variables y  $p$  analitos, las dimensiones de las matrices serán: T y U ( $m \times a$ ), PT ( $a \times k$ ) y QT ( $a \times p$ ). En este método, los loadings no coinciden con la dirección de máxima variabilidad como en los PCA, ya que, están corregidos para obtener la máxima capacidad predictiva para la matriz Y.

En este método, se establece una relación interna entre los scores de las matrices X e Y, de forma que para cada componente a se cumple que

$$u_a = b_a t_a$$

Donde  $b_a$  es el coeficiente de regresión para cada uno de los componentes.

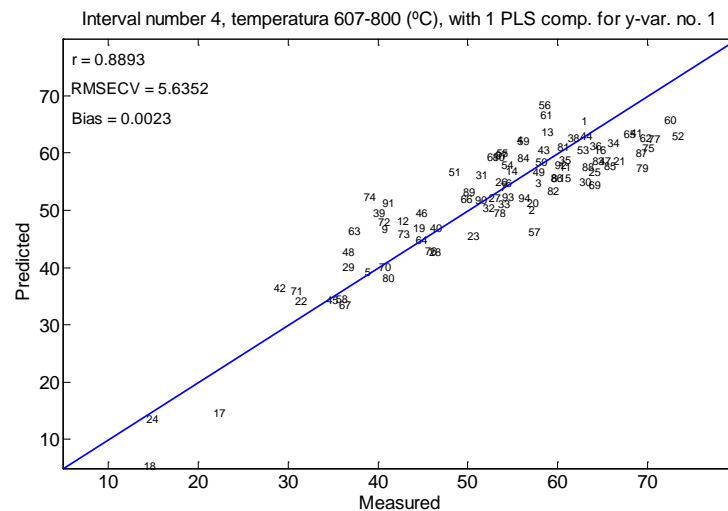
A partir de aquí, se calcula el valor de Y utilizando esta relación

$$Y = TBQ^T + F$$

Donde B es la matriz de los regresores  $b_a$ , de dimensiones  $(a \times a)$  y F la matriz de residuales de Y.

Así se construye un modelo lineal haciendo posible la relación de una característica deseada (y) a partir de un espectro medido (x). Obtendremos el modelo lineal  $Y=XB$ , donde B contiene los coeficientes de regresión que se determinan en el paso de calibración (Norgaard et al., 2000).

El método iPLS desarrolla modelos PLS locales sobre intervalos equidistantes de la región del espectro completo. Su principal ventaja es que proporciona una visión de conjunto de la información relevante en diferentes subdivisiones espectrales, comparando los resultados de la predicción de estos modelos locales con los resultados del modelo del espectro completo. Esta comparación se basa principalmente en el parámetro RMSECV (root mean squared error of cross-validation), que debe ser lo más pequeño posible (Nogaard et al., 2000).



**Figura 1.13.** Recta de ajuste iPLS frente a valores obtenidos de Termogravimetría para lodos de depuradora. En la gráfica se observan los valores de r y RMSECV.

### **1.5.1.3. MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN BASADOS EN LA REDUCCIÓN DE VARIABLES**

Si disponemos de datos de segundo orden o superiores, deben ser desdoblados para poder utilizar los métodos de primer orden, perdiendo, por tanto, la estructura tridimensional de los mismos, acarreando una pérdida de información. Las técnicas que vamos a mostrar, están diseñadas para el tratamiento de datos sin esa pérdida de estructura tridimensional.

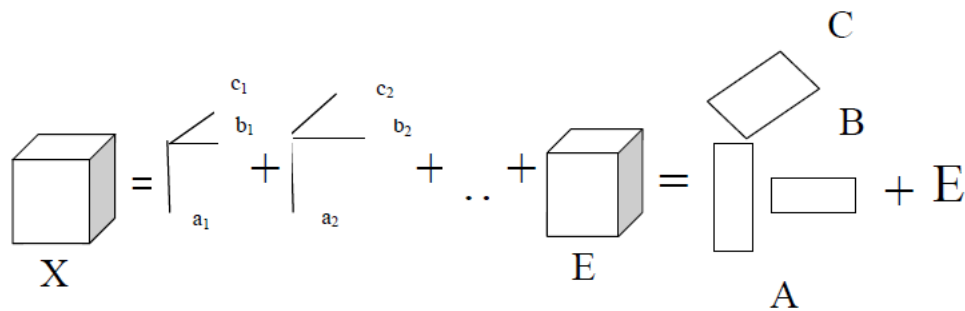
#### **Método PARAFAC (*Parallel Factor Analysis*)**

Este método, debido al incremento de la complejidad de los datos obtenidos en el análisis de muestras en Química, ha ganado interés debido a la capacidad de procesamiento de los ordenadores actuales. PARAFAC y PCA son métodos que descomponen los datos obtenidos en matrices de scores y loadings para reducir variables de caracterización de los sistemas estudiados. La diferencia entre PCA y PARAFAC, está en que el segundo modelo utiliza menos grados de libertad. Kiers (Kiers, 1991) considera el modelo PARAFAC como una versión restrictiva de PCA. PCA es un modelo que utiliza más grados de libertad, pudiendo considerarse que es más complejo y flexible, siendo PARAFAC un modelo más simple y restrictivo.

En el modelo PCA, las matrices tridimensionales son previamente desdobladas en matrices bidimensionales, con la consecuencia de que una variable estará asociada a varios vectores de loadings y no sólo a uno de ellos. Así el PCA utilizará los grados de libertad necesarios para realizar el mejor ajuste posible, sin tener en cuenta la estructura multidimensional. La consecuencia es que PCA puede dar modelos más complejos y difíciles de interpretar ya que el número de parámetros a interpretar será mayor que en PARAFAC.

Podemos decir que utilizar los métodos multidimensionales buscan obtener un modelo más interpretable y robusto que el mejor modelo ajustable a los datos.

El modelo fue propuesto, entre otros, por Harsman (Harsman, 1970), y en él, se llevan a cabo la descomposición de datos en componentes trilineales, dando cada componente un vector de scores y dos de loadings y no uno como en PCA, como se muestra en la figura 1.14.



**Figura 1.14.** Descomposición PARAFAC de datos tridimensionales.

Un modelo PARAFAC viene determinado por tres matrices de loadings, ya que no distingue entre scores y loadings,  $A(I \times F)$ ,  $B(J \times F)$  y  $C(K \times F)$ , donde  $F$  es el número de factores e  $I, J$  y  $K$  pueden considerarse como número de muestras, longitudes de onda y tiempos, respectivamente. El modelo busca minimizar la suma de cuadrados de los residuales  $e_{ijk}$  :

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$

La solución puede ser encontrada utilizando ALS (alternating least squares) mediante iteraciones sucesivas, donde se asume que los loadings en dos de los modos son conocidos, estimando entonces, el conjunto de parámetros desconocido del último modo.

El algoritmo general PARAFAC- ALS se puede describir:

1. Decisión del número de componentes,  $F$
2. Iniciación de  $B$  y  $C$ .
3. Estimación de  $A$  a partir de  $X$ ,  $B$  y  $C$  por mínimos cuadrados.
4. Estimación de  $B$  de igual forma.
5. Estimación de  $C$  de igual forma.
6. Se sigue con el tercer paso hasta la convergencia que marca un cambio pequeño en los loadings.

Como criterio de parada se suele utilizar el criterio de reconocer un cambio relativo en el ajuste de iteraciones inferior a un cierto valor como por ejemplo  $10^{-6}$ , ó que el cambio en los loadings para dos iteraciones sucesivas sea muy pequeño (Tu, 1992).

Debido a la propiedad de solución única que posee este modelo, es más fácil decidir el número de componentes, valorando la interpretabilidad de los loadings, comparando la variación residual con el nivel de ruido intrínseco y utilizando métodos de reordenación de muestras, como por ejemplo, el método de cross validation (Louwerse, 1999).

### **1.5.1.3. ESCALADO MULTIDIMENSIONAL Y ESCALADO MULTIDIMENSIONAL NO LINEAL. MDS Y NLMDS**

Las técnicas de reducción de la dimensionalidad permiten, en ciertos casos, reducir la complejidad de los datos obtenidos para las muestras, y pueden ser manejados por otros algoritmos y obtener información visual de los mismos.

Los datos que manejamos pueden ser de dos tipos, aquellos que son espaciales, que contienen variables semejantes a coordenadas espaciales y, otros, que se pueden denominar temporales, que incorporan a los anteriores la variable tiempo. Cuando el número de variables es mayor que tres, su visualización es compleja. La dimensionalidad se puede reducir ya que, parte de la información que nos aportan los datos, puede ser redundante.

El uso de métodos de reducción de variables permitirá la transformación de los datos, sin una pérdida excesiva de información, en una representación que puede ser entendida por el investigador y que le facilitará el análisis del sistema estudiado (Fray, 2004). Se dispone de un elevado número métodos de reducción de variables, que pueden agruparse en dos grupos dependiendo de si tratan de mantener la topología de los datos o la distancia entre ellos (Lee, et al., 2007). A los primeros pertenece el Principal Component Analysis (PCA), que ya hemos definido con anterioridad. Este método produce proyecciones fácilmente interpretables, pero cuando los datos no son lineales aparece el problema de que sólo representa una transformación lineal ortogonal de los datos.

Los métodos que tratan de mantener las distancias entre los datos de entrada y los puntos proyectados, intentan superar las dificultades que presentan los casos no lineales ya que, las distancias no pueden ser preservadas perfectamente (Venna, J et al., 2007).

### **Multidimensional Scaling (MDS)**

Los métodos Multidimensional Scaling (MDS) se pueden considerar como un conjunto de métodos que tienen como objetivo el originar una serie de puntos, con menor dimensión que los datos de entrada, cuyas distancias mutuas sean lo más parecidas posibles a estos.

MDS utiliza como punto de origen la matriz formada por las distancias euclideas mutuas entre los vectores  $\{x_k\} k=1,\dots,N$  de los datos de entrada.

$$d(x_i, x_j) = \sqrt{((x_i - x_j), (x_i - x_j))}$$

El objetivo es generar una serie de puntos  $\{y_k\} k=1,\dots,N$  con una dimensión menor, de forma que la matriz  $d(y_i, y_j)$  sea lo más semejante posible a la de entrada. Para conseguirlo, se minimizan las denominadas funciones de coste, que van a ser las responsables de las diferencias entre los distintos algoritmos. La función más básica será:

$$E_{MDS} = \sum_{i < j} (d(x_i, x_j) - d(y_i, y_j))^2$$

Esta ecuación constituye el MDS métrico (Kruskal et al., 1978), siendo un algoritmo de tipo lineal que se resuelve como un problema de autovalores que conserva las distancias largas mejor que un PCA, lo que conlleva una mejor representación de la estructura global de los datos, siendo un método más flexible.

### **Nonlinear Mapping (NLM)**

El Nonlinear Mapping (NLM) (Sammon, Jr., 1969) se considera como un tipo de algoritmo MDS, pero que utiliza una función de coste normalizada:

$$E_{NLM} = \frac{1}{\sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^N d(x_i, x_j)} \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^N \frac{(d(x_i, x_j) - d(y_i, y_j))^2}{d(x_i, x_j)}$$

En este método, se mantienen las distancias relativas entre los datos, pero se le da más importancia a las distancias cortas en los datos de entrada, buscando que la estructura de los valores encontrados en el espacio de menor dimensión sea lo más parecidos al de entrada.

Este método, se lleva a cabo de forma iterativa, aplicando técnicas estándar como la variación del método de Newton. Así, utilizando esta variación, se calcula las coordenadas del espacio de salida y:

$$\Delta y_i = \alpha \frac{\left(\frac{\partial E}{\partial y_i}\right)}{\left(\frac{\partial^2 E}{\partial y^2}\right)}$$

Sammon recomienda un valor de  $\alpha$  entre 0,3 y 0,4.

El algoritmo Sammon puede representarse de la siguiente forma:

1. Cálculo de las distancias mutuas  $d(y_i, y_j)$  en el espacio de entrada.
2. Inicializar las coordenadas  $y_i$  de los datos en el espacio de salida. Se puede utilizar PCA o proporcionar valores aleatorios.
3. Cálculo de la variación de las coordenadas de los datos de  $y_i$  utilizando la ecuación

$$\Delta y_i = \alpha \frac{\left(\frac{\partial E}{\partial y_i}\right)}{\left(\frac{\partial^2 E}{\partial y^2}\right)}$$

4. Se actualizan las coordenadas de salida
5. Se vuelve al paso 3 hasta que el valor de la función  $E_{NLM}$  no disminuya.

### **1.5.2. ESTADO DEL ARTE EN EL USO DE TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS EN GESTIÓN DE RESIDUOS**

Para la interpretación de datos de naturaleza multivariante, utilizamos diversas técnicas de esta naturaleza que van a permitir procesar la información que se oculta tras un gran número de datos que se hayan obtenido, por ejemplo mediante métodos espectroscópicos ó cromatográficos. Estos, pueden generar más de 1000 puntos de datos de una muestra, generándose herramientas de análisis que apoyen su interpretación .

Para problemas específicos se utilizan diferentes herramientas, existiendo técnicas de análisis multivariante en distintas ramas científicas como en ingeniería, ciencias ó de administración.



En este apartado se muestra una visión general de los métodos de análisis multivariante aplicados a la investigación y gestión de residuos.

En la práctica, existen diversos paquetes de software disponibles que incluyen distintos métodos de análisis multivariante de datos. Algunas de estas herramientas de software son: SPSS ([www.spss.com](http://www.spss.com)), CANOCO ([www.canoco.com](http://www.canoco.com)), The Unscrambler ([www.camo.com](http://www.camo.com)) y el software libre Rproject ([www.cran.r-project.org](http://www.cran.r-project.org)).

-Análisis por Componentes Principales (PCA):

Este método muestra estructuras ocultas de grandes conjuntos de datos, aplicándose en diferentes campos de la gestión de residuos.

Podemos encontrar su aplicación en el campo de los compost. Zbytewski y Buzewski (2005) aplican PCA para revelar parámetros significativos y sus posibles agrupaciones químicas de análisis de RMN. Campitelli y Ceppi (2008) utilizan PCA para extraer las diferencias entre dos tipos de compost relacionándolos con las calidades de estos. Gil et al. ((2008) lo utilizan para mostrar los efectos del abono de estiércol de ganado al aplicarlo a diferentes suelos. Planquart et al. (1999) lo utilizan para examinar las interacciones entre nutrientes y metales traza en la colza al aplicar lodos de depuradora en suelos. Smidt et al. (2008) mostraron diferencias en las características espectrales de diferentes materiales de desecho. Biasioli et al. (2009) evaluaron las emisiones de olores y la eficiencia de biofiltros en plantas de compostaje mediante espectrometría de masa. Bianchi et al. (2010) aplicaron PCA para estudiar el conjunto de datos obtenidos en el análisis de compuestos orgánicos emitidos al aire en plantas de compostaje y vertederos de RSU. Smidt et al. (2009) aplicaron PCA para mostrar la influencia de los materiales de entrada y de los procesos de operación en compostaje en relación a la humificación de la materia orgánica. Böhm et al. (2011) y Smidt et al. (2011) ilustraron las diferencias espectrales entre diferentes materiales como residuos orgánicos, estiércoles, lodos de depuradoras.

PCA también se ha aplicado al estudio de la alteración de RSU durante el proceso de degradación biológica para su depósito en vertederos. Scaglia y Adani (2008) aplicaron PCA para la creación de un índice de estabilidad para la cuantificación de la reactividad aeróbica de RSU.

En cuanto a la investigación en vertederos, también encontramos aplicaciones de PCA. Mikhailov et al. (2007) aplicaron PCA al seguimiento de datos de diferentes vertederos en los que incluyen parámetros como profundidad, contenido en cenizas, humedad peso de basura en invierno y verano, entre otros. Van Praagh et al. (2009) investigaron los impactos de la emisiones y lixiviados de residuos pretratados y no tratados al ser utilizados como cubiertas de vertederos de RSU. Tintner y Klug (2011) utilizaron PCA para mostrar cómo la vegetación de la cubierta de un vertedero nos muestra sus características. Diener et al. (2010) investigaron la estabilidad, a largo plazo, del acero utilizado para la construcción de la cubierta de un vertedero de RSU.

En la aplicación al estudio de residuos peligrosos, Pablos et al. (2009) utilizan un PCA para la evaluación de bioensayos de toxicidad utilizados en la caracterización biológica de estos residuos.

-Análisis Factorial (FA):

Las diferencias que se encuentran entre FA y PCA son pequeñas. Se diferencian en su concepción matemática, pero el fin de ambas es el de describir la variabilidad de variables observadas en términos de un menor número de variables denominados factores.

En la bibliografía sobre residuos, se utiliza en mayor medida PCA. Srivastava y Ramanathan (2008) utilizan FA para evaluar la calidad del agua subterránea de un vertedero de India. Bustamante et al. (2010) utilizan FA para identificar las principales variables asociadas al compostaje de residuos agroindustriales. Lin et al. (2011) utilizan FA para seleccionar el mejor método de reciclaje de residuos alimentarios.

-Análisis de conglomerados (CA):

Los objetos son clasificados en grupos, llamados cúmulos, atendiendo a distancias entre ellos sin ninguna unidad.

CA ha sido aplicado a la ciencia del compost. He et al. (2011) aplican CA para investigar la materia orgánica extraíble durante el compostaje del estiércol de ganado. Bustamante et al. (2010) estudiaron los parámetros microbiológicos de diferentes compost, evaluándolos mediante un análisis de conglomerados jerárquico. Ros et al. (2006) utilizan CA para identificar

muestras relacionadas y grupos similares de microorganismos. Xiao et al. (2011) utilizan CA jerárquico para estimar la sucesión de comunidades bacterianas durante el proceso de compostaje.

-Análisis de Discriminante (DA):

Permite el establecimiento de agrupaciones. DA pertenece a una técnica de modelado denominada dura. Esto significa que un elemento sólo puede pertenecer a un grupo. Nicolas et al. (2000) realizan un DA para clasificar los datos de una nariz electrónica. Huber- Humer et al. (2011) Aplican DA para determinar la eficiencia de la oxidación del metano de diferentes materiales sobre la base de diferentes variables físicas y químicas.

-Método SIMCA:

En este método, los objetos pueden pertenecer a distintos grupos. Es una técnica denominada de modelado suave.

En la ciencia del compost Malley et al. (2005) utilizó SIMCA para clasificar las diferentes etapas de descomposición de abonos mediante NIR. Smidt et al. (2008) llevaron a cabo un SIMCA para clasificar los diferentes materiales de desecho como el compost o residuos de relleno sanitario en función de su patrón espectroscópico.

- Método de Regresión Lineal Múltiple (MLR), Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS-R):

MLR se dirige a modelar la relación entre dos o más variables explicativas y una variable de respuesta . PLS-R se utiliza para averiguar las relaciones fundamentales entre dos matrices.

En la gestión de residuos MLR fue aplicada por ChiKae et al. (2006) para predecir el índice de germinación de distintos compost. Moreno-Santini et al. (2012) aplicaron MLR para determinar el As y el Pb en el pelo de habitantes de una localidad asentada sobre un antiguo vertedero. Sun et al. (2009) utilizan MLR para predecir la aparición de bacterias mesófilas y termófilas en el compost de residuos alimenticios.

Zvomuya et al. (2006) utilizan PLS-R para predecir la disponibilidad de fósforo en los suelos modificados con estiércol. Böhm et al. (2010) utiliza PLS-R para generar un modelo que prediga

la absorción de oxígeno microbiano en lodos utilizados para compost. Smidt et al. (2010) predicen la DBO, COT, NT y DOC de materiales de vertido a partir de datos espectrales y térmicos. Malley et al. (2005) desarrollan modelos de predicción para pH, N total, nitrato y nitrito, COT, P disponible, S, K y otros elementos por medio de NIR y PLS-R.

*-Parallel Factor Analysis (PARAFAC):*

Representa un análisis de tres vías que permite el análisis de datos de segundo orden, manteniendo la estructura tridimensional de las hipermatrices.

Se han utilizado en la tecnología de residuos. Yu Guan et al. (2010) utilizan los datos obtenidos mediante fluorescencia EEMM junto al método PARAFAC para evaluar la madurez del compost. Miettinen et al. (2004) emplean los métodos PCA junto a PARAFAC para mejorar la descripción de los procesos que tienen lugar en una EDAR.





## 2. Objetivos



## 2. Objetivos

El principal objetivo de esta tesis doctoral es **contribuir al conocimiento de la materia orgánica residual potencialmente valorizable en usos agrícolas, tanto como recurso en bruto como durante el proceso de estabilización mediante compostaje, utilizando métodos químicos de análisis clásicos, técnicas instrumentales y métodos quimiométricos de tratamiento de datos**. El estudio de estos flujos y sistemas aportará información relevante acerca de su posible utilización agronómica y clasificación por origen o técnicas utilizadas, haciendo especial hincapié en los lodos procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales como vector productivo muy significativo a nivel cuali y cuantitativo.

Como el objetivo general es muy ambicioso, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Utilizar los métodos químicos clásicos de análisis para estudiar la variación de la materia orgánica en procesos de co-compostaje de residuos ganaderos y vegetales de diferentes procedencias.
- Utilizar los métodos instrumentales de análisis térmico, FT-IR, CPMAS13 CNMR y EEMM-fluorescencia para estudiar la materia orgánica en procesos de co-compostaje de residuos ganaderos y vegetales de diferentes procedencias y la materia orgánica soluble procedente de lodos de depuradoras.
- Utilizar las herramientas quimiométricas para interpretar los espectros de EEMM-fluorescencia de la materia orgánica soluble de muestras de lodos de depuradoras de distintas procedencias y diferentes tratamientos de estabilización.
- Implementar los métodos químicos clásicos de análisis y los métodos instrumentales de análisis, las aportaciones de las herramientas quimiométricas al estudio de la materia orgánica en diferentes sistemas de compostaje y lodos de depuradoras.
- Utilizar y contrastar las técnicas de espectroscopía FT-IR, termogravimétricas y de CPMAS13 CNMR con los indicadores de madurez más tradicionales durante el co-compostaje de orujo desalcoholizado con estiércol de vacuno y con gallinaza y orujo alcoholizado con estiércol de vacuno, determinando el valor agronómico de los mismos.

En los cuatro artículos que componen esta tesis, se ven reflejados estos objetivos, que tratan los siguientes temas específicos:

1. mostrar las posibilidades de las herramientas quimiométricas y del modelo PARAFAC para interpretar los espectros de EEMM-fluorescencia de la materia orgánica soluble (WSOM) de muestras de lodos de depuradoras de distintas procedencias y diferentes tratamientos de estabilización.
2. Mostrar las posibilidades del análisis térmico y de las herramientas quimiométricas, para comprender la complejidad de la materia orgánica presente en los lodos de aguas residuales.
3. Utilizar las técnicas del análisis térmico, CPMAS 13 CNMR y espectroscopía FT-IR para estudiar los cambios producidos durante el proceso de compostaje de pilas formadas por co-compostaje de purines y residuos vegetales de algodón.
4. Estudiar el proceso de co-compostaje de residuos de la industria de bodega y destilería con estiércol de animales, utilizando los métodos químicos clásicos junto con métodos instrumentales avanzados (análisis térmico, FT-IR y técnicas de CPMAS 13 CNMR).





### 3. Publicaciones



### Publicación 3.1

---

**CHARACTERIZATION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER FROM SEWAGE SLUDGE USING 3D-  
FLUORESCENCE SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRIC TOOLS**

Julio Martín-Mata, Frutos C. Marhuenda-Egea, Raúl Moral, Angel Torres-Climent, Encarnación  
Martínez-Sabater, Concepción Paredes, Xavier Barber y Javier Morales,

*Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46 (2015) 188-196



## Characterization of Dissolved Organic Matter from Sewage Sludge using 3D-Fluorescence Spectroscopy and Chemometric Tools

JULIO MARTIN-MATA,<sup>1</sup> FRUTOS C. MARHUENDA-EGEA,<sup>2</sup>  
RAÚL MORAL,<sup>1</sup> ANGEL TORRES-CLIMENT,<sup>1</sup>  
ENCARNACIÓN MARTÍNEZ-SABATER,<sup>2</sup> CONCEPCIÓN  
PAREDES,<sup>1</sup> XAVIER BARBER,<sup>3</sup> AND JAVIER MORALES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Agrochemistry and Environment, Miguel Hernandez University, Orihuela, Alicante, Spain

<sup>2</sup>Department of Agrochemistry and Biochemistry, University of Alicante, Alicante, Spain

<sup>3</sup>Research Institute “Operation Research Center,” Miguel Hernandez University, Elche, Alicante, Spain

*The aim of the present article is to show the possibilities of chemometric tools and the parallel factor analysis (PARAFAC) model, as well as to understand the complexities of the fluorescence emission-excitation matrix (EEM) of water-soluble organic matter (WSOM) extracted from sewage sludge samples obtained with different origins and stabilization procedures. The variation in the composition of WSOM in the different sewage sludge samples could be correlated with the conditions of stabilization; therefore, the use of fluorescence spectroscopy to monitor these changes can be a useful tool to optimize the management of this residual flux, avoiding environmental pollution. However, the “contour density” EEM maps obtained with fluorescence present continuous spectra with different peaks, valleys, and shoulders where manual peak picking can be complicated and subjective, especially in complex matrixes such as sewage sludge. With the PARAFAC algorithm, it is possible to resolve the emission and excitation spectra of the different fluorescence components present in the samples and their contribution to the total fluorescence. Also, the contribution (scores) of the different fluorophors can be coupled with another chemometric tool to provide an effective classification method using the stabilization conditions of sewage sludge as main criterion. In this study, a wide survey of sewage sludge samples (287) was characterized by fluorescence emission-excitation matrix. The final molecular composition of the sewage sludge samples was not related to the stabilization (aerobic vs anaerobic) treatments. However, a sewage sludge classification based on a combined spectroscopic-chemometric approach was obtained, which could be used for the optimization of sewage sludge use in agriculture, minimizing the environmental risks.*

**Keywords** Fluorescence spectroscopy, PARAFAC, sewage sludge, water-soluble organic matter

Address correspondence to Frutos C. Marhuenda-Egea, Department of Agrochemistry and Biochemistry, University of Alicante. Ap. 99, E-03080 Alicante, Spain. E-mail: [frutos@ua.es](mailto:frutos@ua.es)

## Introduction

The optimization of sewage sludge (SS) management is a rising topic in the agenda of the international decision makers, especially considering environmental constraints such as nutrient runoff, heavy-metal content, and sanitization issues. The knowledge about the molecular nature of SS is the primary information needed to understand key processes, such as mineralization and immobilization. This is especially true in the water-soluble organic-matter (WSOM) pool, because of its biodegradability and mobility across the environmental compartments. An increasing percentage of SS is being used in agriculture in the USA and in the economically developed European countries. The production in Europe is about 9.4 million tons per year, according to the European Environmental Agency, being used the 54 percent for agricultural purposes. The strategy to decide the application rate is usually based on the specific composition of SS to verify the maximum total nitrogen (N) input in soils (less than 210 kg N/ha in nonsensitive areas). However, in many cases, SS is applied to soils without this information, because specific fully characterization is expensive and very time-consuming (Galvez-Sola et al. 2009).

In addition, wastewater composition, depuration treatments, and especially the type of SS stabilization could modify the organic-matter nature of final SS. In addition, total soil organic matter (SOM) in amended soils is very conditioned by the type of organic amendment used (Griffin and Porter 2004; Galvez-Sola et al. 2009), such as SS. The chemical and molecular nature of organic matter can be determined by spectral methods, such as fluorescence or/and infrared spectroscopy (Marhuenda-Egea et al. 2007). Fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectroscopy is a sensitive and rapid technique that provides more detailed information about the fluorescence properties of WSOM; EEM spectroscopy measures the emission spectra over a wide range of excitation wavelengths, resulting in a three-dimensional picture of fluorescence intensity as a function of excitation and emission wavelength. This technique has been applied to the studies of WSOM from different sources (Coble 1996; Mobed et al. 1996; Parlanti et al. 2000; Provenzano et al. 2001; Baker 2002; Chen et al. 2003; Sierra et al. 2005; Hudson, Baker, and Reynolds 2007; Marhuenda-Egea et al. 2007). Frequently, it is not possible to obtain EEM spectra with peak isolates, owing to heterogeneity of the WSOM. A manual "peak peaking" of the EEM fluorescence spectra of WSOM suggests the presence of different fluorophores, each one characterized by an Ex/Em wavelength pair (Marhuenda-Egea et al. 2007). However, the election of the fluorescence peaks can be difficult, being more appropriate to divide the EEM spectrum in different regions (Chen et al. 2003), although the problem about the overlap between peaks is not raised with this analysis.

To improve the analysis of WSOM, the parallel factor analysis (PARAFAC) can be applied to the EEM fluorescence spectra obtained for the WSOM from SS samples. Parallel factor analysis (PARAFAC), a multiway data analysis method, has been shown to model the suite of complex EEM landscapes into chemically meaningful spectral and concentration components (Bro 1997; Andersen and Bro 2003; Ohno and Bro 2006) in complex environmental samples.

In the present research, SS samples from different origins and stabilization processes (aerobic and anaerobic) were characterized using spectroscopic and chemometric tools. The main objective was to classify the SS samples to optimize the management of these residual fluxes and also to avoid environmental pollution after its use as organic amendment in agriculture.

## Material and Methods

### *Characterization of the Sewage Sludge Samples*

Two hundred eighty-seven SS samples were collected from eighty different wastewater treatment plants in southern Spain during the period 2001–2007. The accumulated equivalent population of the studied area was more than 500,000 inhabitants. The treated volume of wastewater per year was about 200 hm<sup>3</sup>, with a sludge production of 80,000 tons, approximately. The SS samples were originated by aerobic or anaerobic stabilization using different wastewater treatments (61.3 percent by prolonged aeration, 29.2 percent by active sludge, 2.2 percent from percolator filters, 1.1 percent from biocylinders, 3.3 percent from biodisks, and 2.9 percent from compost). All samples were dried, grounded, dried again at 60 °C, and stored prior to their analysis.

### *Sample Preparation and Fluorescence Analysis*

Four g of each sample of SS was extracted with 20 mL of deionized water by shaking it for 24 h at room temperature. The extracts were filtered through Whatman No. 2 paper, and 1 mL of each sample was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min in a SIGMA 2K15 centrifuge (rotor no. 12143).

Fluorescence spectra were obtained with a Jasco Model FP-6500 spectrofluorometer (Jasco, Easton, MD). Excitation source was a 150-W xenon lamp. Contour maps of EEM spectra were obtained on water extracts of the sewage sludge samples; 100  $\mu$ L of the sample, already filtered and centrifuged, was diluted in 2 mL of 20 mM phosphate buffer pH 8.0. The emission (Em) wavelength range was fixed from 220 to 460 nm, whereas the excitation (Ex) wavelength was increased from 220 to 400 nm in 5-nm steps in excitation and in 2-nm steps in emission. Slit widths were 5 nm, and the compost extract was irradiated in a 1-cm-path-length fused silica cell (Hellma). The UV-visible of the diluted samples was acquired (Shimadzu UV-160 spectrophotometer, 200–800 nm, 1-cm quartz cuvette; Shimadzu, Tokyo, Japan) and the absorbance was always less than 0.1 at 254 nm in order to reduce the absorbance of the solution and eliminate potential inner filter effects (Mobed et al. 1996).

Data preprocessing was used to minimize the influence of scatter effects (Rayleigh and Raman effects) in the EEM data. An excision-interpolation technique was used to eliminate Rayleigh and Raman scattering peaks before PARAFAC modeling (Bahram et al. 2006). The PARAFAC modeling approach has been exposed in detail elsewhere (Bro 1997; Andersen and Bro 2003; Ohno and Bro 2006). A nonnegativity constraint was applied to the parameters to allow only chemically relevant results, because negative concentrations and fluorescence intensities are chemically impossible, assuming that quenching and inner filter effects are negligible. The PARAFAC models with two to six components were computed. The determination of the correct number of components in the data set was assessed by the core consistency diagnostic score (CONCORDIA), which should be close to 100 percent for appropriate models. The core consistency provides an estimate of how well the model captures trilinear information. If the consistency turns low, that is, toward zero, it is a strong indication that the model is invalid (Bro and Kiers 2003). The PARAFAC model was fitted in MATLAB ver. 6.5.1 using the N-way toolbox (available at <http://www.models.kvl.dk>), using AMD Turion X2, 2.20 GHz processor with 4 GB of RAM. In the contour maps the increment of contour lines was 5.

### Statistical Analysis

The score data from PARAFAC model were analyzed by multidimensional scaling (MDS) (Wehrens 2011) to reconstruct a low-dimensional map of samples that leads to the same similarity matrix as the original data. We used the function *Sammon*, which is available in the MASS package (R project). Before the multivariate analysis, we calculated the percentage of summed maximum fluorescence (each score component divided by the sum of the five score components). This percentage removed the concentration effect and we can obtain a better picture of the possible correlations between components.

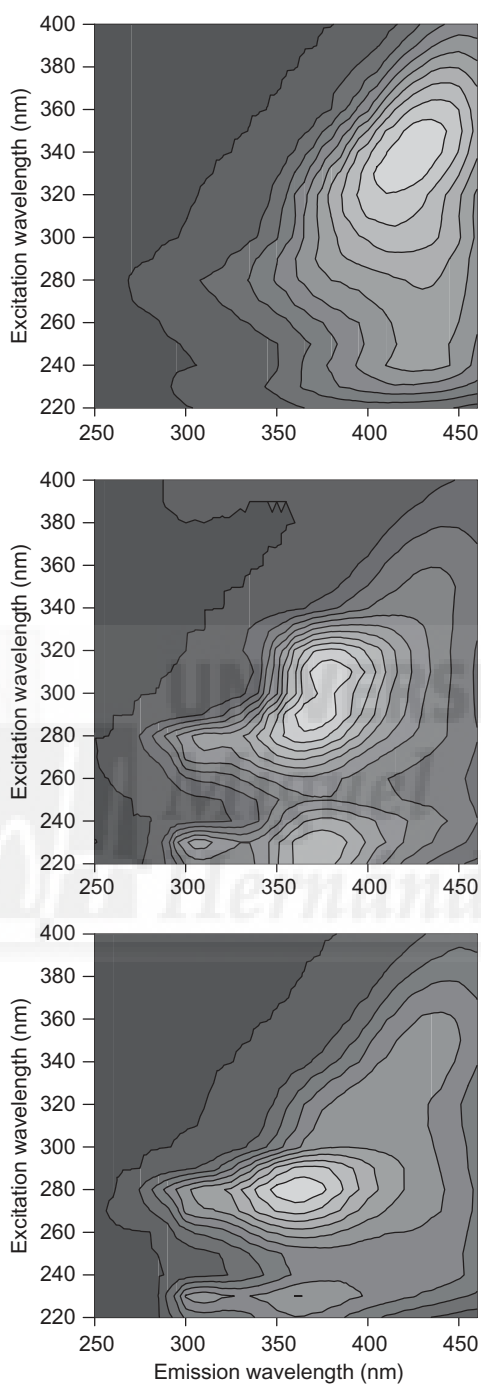
## Results and Discussion

### *EEM Fluorescence Spectra and PARAFAC Modelling of Water-Soluble Organic Matter (WSOM)*

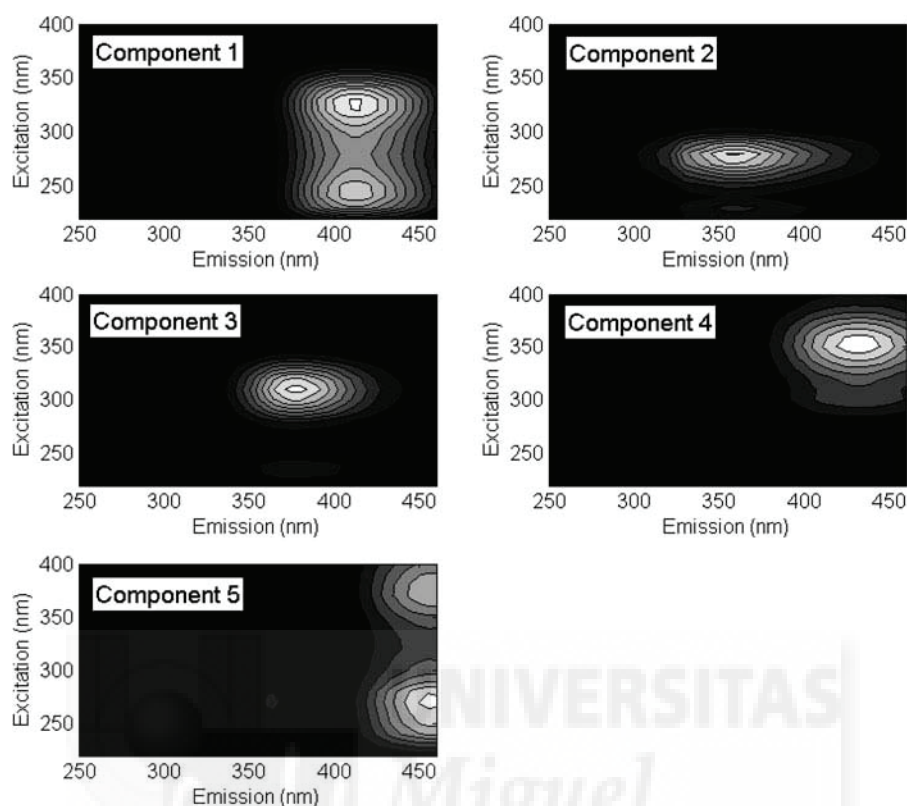
Contour EEM spectra of WSOM from three SS samples are shown in Figure 1. The spectra indicate the presence of different fluorophores, each one characterized by an Ex/Em wavelength pair. Contour EEM spectrum is the result of the contribution of different fluorophores. Using the manual location of the maximum fluorescence intensity (“peak picking”) makes it very difficult to identify the fluorophores. A multiway data analysis method, such as parallel factor analysis (PARAFAC), makes it possible to break down the contour EEM spectra in chemically meaningful spectrum components. These components were mathematical constructs, whose modeled parameters closely mimic the experimental EEM spectra of WSOM extracts from SS. It is not possible to assure that PARAFAC-derived components are real molecules, but it can be associated to different biomolecules such as humic and fulvic substances or peptides (Ohno and Bro 2006). For the WSOM from SS samples, PARAFAC models with two to six components were calculated. The most appropriate number of components was assessed using the CONCORDIA method, which should be close to 100 percent for appropriate models. The CONCORDIA scores for the two- to six-component models were 99.1, 97.2, 86.3, 81.0, and 46.9 respectively. The five-component model, with a CONCORDIA value of 81.0, explained >98 percent of the fluorescence data variability and was therefore selected as the appropriate multiway data model to describe the data set.

The excitation and emission spectral loadings for the five components were displayed in Figure 2. The presence of humic-like substances and peptide-containing aromatic amino acids in WSOM from different environments produced qualitatively similar EEM spectra (Ohno and Bro 2006). The first, fourth, and fifth PARAFAC-derived components had spectral peaks in wavelengths ranges associated with humic and fulvic materials (Figure 2) (Leenheer and Croué 2003; Bertoncini et al. 2005; Sierra et al. 2005; Ohno and Bro 2006). The second and third PARAFAC-derived components are generally associated to microbial by-product-like material (Stedmon and Markager 2005; Ohno and Bro 2006). The second PARAFAC-derived component has a microbial origin, but it is associated with proteins containing residues of tryptophan and tyrosine (Leenheer and Croué 2003; Yamashita and Tanoue 2003). The scores from the first loading of the PARAFAC model are an estimate of the component concentrations for each WSOM from SS sample. These scores are not chemical concentrations of fluorophores in the sample, because fluorescence depends on the quantum efficiencies and these data are unknown. However, these signal-based concentrations could be used in another chemometric analysis, such as principal components analysis (PCA), to achieve a better characterization of the WSOM.





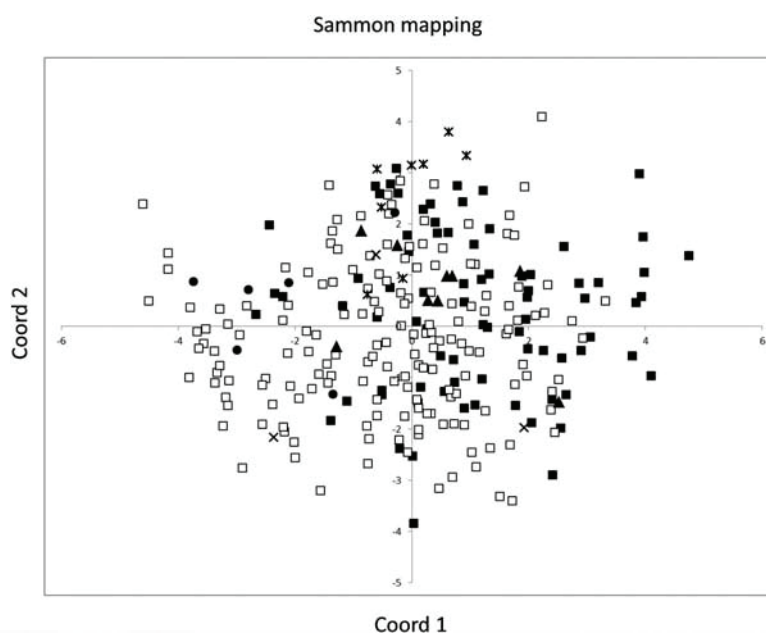
**Figure 1.** Excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectra from different sewage sludge samples.



**Figure 2.** Excitation and emission spectral loadings of the non-negativity-constrained five-component PARAFAC model of the sewage sludge samples.

### *Multidimensional Scaling (MDS)*

Changes of SS samples composition are visualized by Sammon mapping (Figure 3). Score data from PARAFAC model were analyzed by MDS method. *Sammon* mapping decreased the influence of large distances, which can dominate the map completely. The score data were dominated by the DOM concentration. We worked with the percentage of summed maximum score data (each score PARAFAC-derived component divided by the sum of all the five score PARAFAC-derived components) to remove the concentration effect. The negative part of the x axis in the Sammon mapping was dominated by the samples with wastewater treatments by prolonged aeration. In this region we found the wastewater treatments by percolator filters. The positive part of the x axis in the Sammon mapping was dominated by the samples with wastewater treatments by active sludge. The compost samples were in the positive part of the y axis in the Sammon mapping (Figure 3). Therefore, the chemical nature of the WSOM from SS can be classified at a basic level using this approach, thinking of the potential uses of SS, including agricultural use. This knowledge is a key result for the establishment of an optimized use of SS in agriculture, without any environmentally associated risk. The WSOM is the fraction of organic matter that is available for the microorganisms and plants, and this fraction can cause the most evident environmental damage, such as the death of animals and plants. High fluorescence of the SS samples was not probably adequate for an environmentally friendly use. The best SS



**Figure 3.** Multidimensional scaling approaches on the scores PARAFAC-derived data obtained from the EEM spectra of sewage sludge samples. (□) prolonged aeration, (■) active sludge, (●) percolator filters, (▲) from biocylinders, (×) from biodisks, and (\*) from compost.

samples for agricultural use were the samples with low fluorescence due to their lower biodegradability and therefore long-lasting effects in physical and physicochemical properties in amended soils. These SS samples had lower fluorescence intensity, for the signals from all PARAFAC-derived components (microbial by-products, peptides, and humic-like materials). It is reasonable to think that these SS samples could be more stabilized and thus be potentially less dangerous for the environment.

### Conclusions

In this study, the water-soluble organic matter from SS showed great variability related to its generation (influent nature, sewerage treatment, stabilization processes, etc.). Therefore, the analysis by EEM fluorescence and the chemometric analysis of WSOM also reflected this variability in the molecular composition of OM in SS samples. Also, any significant correlation between WSOM and aerobic or anaerobic stabilization of SS was found. However, by combining spectroscopic and chemometric approaches, it is possible to classify SS in different groups, which could help in the decision making related to SS management, especially to maximize the agronomical properties and minimize the environmental risks. More research must be done to validate this classification in incubation assays and field experiments.

### Funding

This work has been financed by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and European Regional Development Funds (ERDF) (AGL2009-12371-C02-01) and the University of Alicante (UAUSTI09-08) Project.

## References

- Andersen, C. M., and R. Bro. 2003. Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data. *Journal of Chemometrics* 17: 200–15. doi:10.1002/cem.790
- Bahram, M., R. Bro, C. Stedmon, and A. Afkhami. 2006. Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. *Journal of Chemometrics* 20: 99–105. doi:10.1002/cem.978
- Baker, A. 2002. Fluorescence properties of some farm wastes: Implications for water quality monitoring. *Water Research* 36: 189–95. doi:10.1016/S0043-1354(01)00210-X
- Bertoncini, E. I., V. D'Orazio, N. Senesi, and M. E. Mattiazzo. 2005. Fluorescence analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian oxisols as affected by biosolid amendment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381: 1281–88. doi:10.1007/s00216-005-3054-2
- Bro, R. 1997. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 38: 149–71. doi:10.1016/S0169-7439(97)00032-4
- Bro, R., and H. Kiers. 2003. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *Journal of Chemometrics* 17: 274–86. doi:10.1002/cem.801
- Chen, W., P. Westerhoff, J. A. Leenheer, and K. Booksh. 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37: 5701–10. doi:10.1021/es034354c
- Coble, P. G. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51: 325–46. doi:10.1016/0304-4203(95)00062-3
- Galvez-Sola, L., R. Moral, J. Moreno-Caselles, M. D. Perez-Murcia, A. Perez-Espinosa, M. A. Bustamante, and C. Paredes. 2009. Effectiveness of near infrared reflectance spectroscopy in the quick evaluation of nitrogen content in sewage sludge. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 40: 726–35. doi:10.1080/00103620802695024
- Griffin, T. S., and G. A. Porter. 2004. Altering soil carbon and nitrogen stocks in intensively tilled two-year rotations. *Biology and Fertility of Soils* 39: 366–74. doi:10.1007/s00374-004-0725-7
- Hudson, N. J., A. Baker, and D. Reynolds. 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural waste and polluted waters: A review. *River Research and Applications* 23: 631–49. doi:10.1002/rra.1005
- Leenheer, J. A., and J.-P. Croué. 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37: 18A–26A. doi:10.1021/es032333c
- Marhuenda-Egea, F. C., E. Martínez-Sabater, J. Jordá, R. Moral, M. A. Bustamante, C. Paredes, and M. D. Pérez-Murcia. 2007. Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: Evaluation of the process by fluorescence excitation-emission matrix. *Chemosphere* 68: 301–09. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.075
- Mobed, J. J., S. L. Hemmingsen, J. L. Autry, and L. B. McGown. 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: Total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science and Technology* 30: 3061–65. doi:10.1021/es960132l
- Ohno, T., and R. Bro. 2006. Dissolved organic matter characterization using multiway spectral decomposition of fluorescence landscapes. *Soil Science Society of America Journal* 70: 2028–37. doi:10.2136/sssaj2006.0005
- Parlanti, E., K. Wörz, L. Geoffroy, and M. Lamotte. 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry* 31: 1765–81. doi:10.1016/S0146-6380(00)00124-8
- Provenzano, M. R., S. C. de Oliveira, M. R. Santiago Silva, and N. Senesi. 2001. Assessment of maturity degree of composts from domestic solid wastes by fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5874–79. doi:10.1021/jf0106796
- Sierra, M. M. D., M. Giovanela, E. Parlanti, and E. J. Soriano-Sierra. 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58: 715–33. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.038

- Stedmon, C. A., and S. Markager. 2005. Resolving the variability of dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnology and Oceanography* 50: 686–97. doi:10.4319/lo.2005.50.2.0686
- Wehrens, R. 2011. *Chemometrics with R: Multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences*. Berlin: Springer-Verlag.
- Yamashita, Y., and E. Tanoue. 2003. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry* 82: 255–71. doi:10.1016/S0304-4203(03)00073-2





## Publicación 3.2

---

### USE OF THERMAL METHODS AND CHEMOMETRIC TOOLS TO OPTIMIZE THE AGRONOMIC MANAGEMENT OF BIOSOLIDS.

J. Martín-Mata; A. Torres-Climent; M.P. Gomis; F.C. Marhuenda-Egea, M. A. Bustamante, M.D.  
Pérez-Murcia, A. Pérez-Espinosa, C. Paredes, R. Moral

*Journal of Environmental Management* (en revisión).





De: [ees.jema.0.31a0e9.8c85ce68@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.jema.0.31a0e9.8c85ce68@eesmail.elsevier.com)

[ees.jema.0.31a0e9.8c85ce68@eesmail.elsevier.com] en nombre de Journal of Environmental Management [jem@j-envman.com]

Enviado: lunes, 01 de junio de 2015 6:22

Para: Bustamante Muñoz, Maria De Los Angeles; Bustamante Muñoz, Maria De Los Angeles; [mabm@cebas.csic.es](mailto:mabm@cebas.csic.es)

Asunto: A manuscript number has been assigned JEMA-D-15-01492

Ms. Ref. No.: JEMA-D-15-01492

Title: Use of thermal methods and chemometric tools to optimize the agronomic management of biosolids Journal of Environmental Management

Dear Dr. Bustamante,

Thank you very much for submitting the above-referenced manuscript to the Journal of Environmental Management. We will contact you with a decision as soon as possible.

Your submission has been assigned the following manuscript number: JEMA-D-15-01492

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jema/>.

Your username is: [marian.bustamante@umh.es](mailto:marian.bustamante@umh.es)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/JEMA/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/JEMA/automail_query.asp)

Kind regards,

Administrative Support Agent

Administrative Support Agent [02-Feb-11] Journal of Environmental Management

\*\*\*\*\*

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Environmental Management  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Use of thermal methods and chemometric tools to optimize the agronomic management of biosolids

Article Type: Research Paper

Keywords: thermogravimetry; organic matter; sewage sludge; multidimensional scaling (MDS).

Corresponding Author: Dr. M. A. Bustamante, PhD

Corresponding Author's Institution: University Miguel Hernandez

First Author: J. Martin-Mata

Order of Authors: J. Martin-Mata; A. Torres-Climent; M.P. Gomis; F.C. Marhuenda-Egea, PhD; M. A. Bustamante, PhD; M.D. Pérez-Murcia, PhD; A. Pérez-Espinosa, PhD; C. Paredes, PhD; R. Moral, PhD





Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

División de Edafología y Química Agrícola

May 29, 2015

Dear Editor,

Please find enclosed the original of the manuscript entitled “*Use of thermal methods and chemometric tools to optimize the agronomic management of biosolids*”, for possible publication in the JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT.

The files are the following:

Manuscript: Manuscript Martin-Mata et al.doc

Tables and figures in: Table 1 Figure 1 Figure 2 Figure 3 Figure 4

Figure captions: Figure captions.doc

### 1. Submission of the work

#### All authors of this work:

J. Martin-Mata

A. Torres-Climent

M.P. Gomis

F.C. Marhuenda-Egea

M.A. Bustamante

M.D. Pérez-Murcia

A. Pérez-Espinosa

C. Paredes

R. Moral

**agree to submit this work to the Journal of Environmental Management and certify that this work has not been published/submitted or being submitted to another journal.**

### 2. Novelty and significant contribution of the paper

All the authors confirm the novelty and significant contribution of this work, whose main purpose is to evaluate the feasibility of the combined use of thermal analysis and chemometric tools to understand the complexities of the organic matter present in sewage sludge samples obtained with different origin and stabilization procedures, in order to optimize their agricultural use, avoiding potential environmental impacts.

### 3. Transference of the copyright

In consideration of the publication of my contribution in the Journal of Environmental Management, I hereby assign to this journal the present copyright. This transfer includes the right to adapt the article for use with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems.

Looking forward to hearing from you.

Yours faithfully,

Dra. María Ángeles Bustamante

e-mail: [marian.bustamante@umh.es](mailto:marian.bustamante@umh.es)

**Highlights (for review)**  
[Click here to view linked References](#)

### **Highlights**

Thermal analysis can be used to assess organic matter complexities in biosolids.

The combination of thermal analysis and MDS allows to classify the sludge samples.

Thermal analysis showed the variability in the biosolids organic matter composition.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Use of thermal methods and chemometric tools to optimize the  
agronomic management of biosolids**

Martin-Mata, J.<sup>1</sup>, Torres-Climent, A.<sup>1</sup>, Gomis, M.P.<sup>1</sup>, Marhuenda-Egea, F.C.<sup>2</sup>, Bustamante,  
M.A.<sup>1</sup>, Perez-Murcia, M.D.<sup>1</sup>, Perez-Espinosa, A.<sup>1</sup>, Paredes, C.<sup>1</sup>, Moral, R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Agrochemistry and Environment, Miguel Hernandez University, EPS-  
Orihuela, ctra Beniel Km 3.2, 03312-Orihuela (Alicante), Spain.

<sup>2</sup>Department of Agrochemistry and Biochemistry. University of Alicante, Apartado 99,  
E-03080 Alicante, Spain.

---

Corresponding author: M.A. Bustamante

Phone: +34 966749655 Fax: +34 966749710

E-mail address: [marian.bustamante@umh.es](mailto:marian.bustamante@umh.es)

## Abstract

1  
2 The incorporation of biosolids into agricultural soils currently constitutes one of the  
3  
4 main uses of this type of wastes. However, the high variability in their organic matter  
5  
6 composition requires a complete analytical characterization that guarantees their safe  
7  
8 use, avoiding potential environmental impacts. This characterization is time-consuming  
9  
10 and expensive, which implies that, in many occasions, sewage sludge is incorporated  
11  
12 into soils without this information. Therefore, the aim of this work was to show the  
13  
14 possibilities of the combined use of thermal analysis and chemometric tools to  
15  
16 understand the complexities of the organic matter present in sewage sludge samples  
17  
18 obtained with different origin and stabilization procedures. The results of thermal  
19  
20 analysis showed the variability in the organic matter composition of the biosolids,  
21  
22 mainly conditioned by different variables, such as population equivalent (Pe), type of  
23  
24 treatment plant, type of sludge stabilization or by the use of the sewage sludge. Also, a  
25  
26 classification of the biosolids studied based on a combined thermogravimetry-  
27  
28 chemometric approach was also obtained, which could be used for the optimization of  
29  
30 sewage sludge use in agriculture, minimizing the environmental risks.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Keywords:** thermogravimetry, organic matter, sewage sludge, multidimensional scaling (MDS).

## 1. Introduction

In the last years, the generation of sewage sludge in wastewater treatment plants is becoming an important problem, since the increasingly stringent wastewater treatment requirements has produced an important rise in the amounts of sewage sludge generated, the production of sludge in Europe ranging between 16–94 g dry basis/person·day, depending on the country studied (Magdziarz and Werle, 2014).

As an example, the implementation of wastewater management regulations has caused approximately 10 million tons of additional sewage sludge generated yearly since 2005 (Werle and Wilk, 2010).

Sewage sludge is the residual matter obtained from the treatment processes of household and industrial wastewaters (Magdziarz and Werle, 2014). It contains microorganisms and harmful substances, such as heavy metals, poorly biodegradable organic compounds, bacteria, viruses, pharmaceuticals, hormones and dioxins, which make their disposal difficult (Seggiani et al., 2012). Thus, sewage sludge disposal constitutes one of the major challenges of sustainable wastewater engineering and the cost may be as high as 50–60% of the total operational costs of the wastewater treatment plants (Li et al., 2013). In Europe, the recycling of sewage sludge is a preferred concept in sludge management (Zbytniewski and Buszewski 2005), due to the significant environmental impacts associated with landfills, incineration, and to a lesser degree, with disposition in the sea (Torrecillas et al., 2013). In this sense, the use of biosolids as organic amendments has become a common practice that reduces the biodegradable fraction sent to landfills or incineration and it can also imply potential benefits for the soil. However, the incorporation of sewage sludge to agricultural soils must be done properly, paying special attention to the form and timing of the application, in order to avoid potential detrimental effects on the soil properties and/or

1 minimize environmental or health hazards derived from their use. Most of the studies  
2 concerning the effects of the incorporation of biosolids into soils have focused on the  
3 biological fertility of soil and, especially on the availability of heavy metals and toxic  
4 organic compounds (Roig et al., 2012; Wang et al., 2008; Milinovic et al., 2014), but  
5 the effects of the degree of stabilization of the biosolids are less known. Thus, it is also  
6 essential to assess the characteristics and degree of stability of the organic matter of  
7 sewage sludge to ensure its environmental safety, and to provide an efficient agronomic  
8 performance in the soil (Fernández et al., 2012).

9 Several methods, such as chemical and/or biological (Torrecillas et al., 2013; Adani et  
10 al., 2004) and spectroscopic (Smidt et al., 2002; Grube et al., 2006) have been used to  
11 characterize sewage sludge and to evaluate its degree of stability. However, most of  
12 these methods require a previous extraction and/or fractionation and do not provide  
13 enough information without being combined with other techniques. Therefore, in many  
14 occasions, biosolids are incorporated into soils without knowing the exact composition.  
15 Thermal degradation techniques, such as thermogravimetry (TG), derivative  
16 thermogravimetry (DTG), differential thermal analysis (DTA) and differential scanning  
17 calorimetry (DSC) have been proposed as reproducible, rapid, informative, low-cost and  
18 small-sample consuming methods to characterize structural features of decayed natural  
19 heterogeneous organic matter in different materials, providing important information  
20 about the chemical characteristics of the sample (Plante et al., 2009). Thermal methods  
21 are based on programmed heating of the samples in a controlled atmosphere. Different  
22 components in the sample, which undergo transformations at different temperatures,  
23 produce a graph whose shape reflects the chemical composition and structure of the  
24 sample (Mondini et al. 2003). Different studies have reported the use of thermal



1 techniques to analyse organic wastes (Provenzano et al., 2000; Baffi et al., 2007; Gómez  
2 et al., 2007; Fernández et al., 2012).  
3

4 Therefore, the main objectives of this work were to evaluate the use of thermal methods  
5 to characterize different sewage sludge samples and also, to elucidate if the combined  
6 use of these techniques with chemometric tools, such as the multidimensional scaling,  
7 can allow to identify the specific features of the organic matter present in these  
8 materials and thus, provide rapid information prior to their agricultural use.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 19 **2. Materials and methods**

### 20 *2.1 Sewage sludge samples*

21 A total of 94 sewage sludge samples were collected from 80 different wastewater  
22 treatment plants located in south-eastern Spain, during the period 2001-2007. The  
23 accumulated equivalent population of the considered area was over 500,000 inhabitants.  
24 The treated volume of wastewater was about 200 hm<sup>3</sup> per year, with a production of  
25 biosolids of 80,000 t, approximately. The samples were classified according the type of  
26 treatment plant, the size of the population treated, the sludge conditioning and the final  
27 destination of the biosolids generated. The samples were originated by aerobic or  
28 anaerobic stabilization using different wastewater treatments (61.3% by prolonged  
29 aeration, 29.2% by active sludge, 2.2% from percolator filters, 1.1% from biocylinders,  
30 3.3% from biodisks and 2.9% from compost). All samples were dried at 50°C,  
31 grounded, dried again at 60 °C and stored prior to their analysis.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

### 52 *2.2 Chemical analysis*

53 The parameters analysed in the sewage sludge samples (in triplicate) were the  
54 following: total organic matter (TOM), total organic carbon (TOC), total Kjeldahl  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 nitrogen (TKN), water-soluble nitrogen (WSN), water-soluble C (WSC), extractable  
2 organic C (Cex), fulvic acid-like C (Cfa) and humic acid-like C (Cha). The dry matter  
3 contents of the samples were determined after drying at 105 °C during 12 h; TOM was  
4 determined by loss on ignition at was determined by loss on ignition at 540 °C for 4 h  
5 after the extraction of inorganic matter with HCl; TOC was determined by dry  
6 combustion at 950 °C using an elemental analyzer (Truspec CN, Leco, St Joseph, Mich.,  
7 USA) according to the methods described by Galvez-Sola et al. (2010). WSC and WSN  
8 were determined in a water extract of 1:10 (w/v), after filtration through a synthetic  
9 filter with a pore diameter of 0.45 µm, by using an automatic analyzer for liquid  
10 samples (TOC-V CSN Analyzer, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) (Bustamante et  
11 al., 2012, as were the humic-like fractions (0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH-extractable organic  
12 carbon (Cex) and fulvic acid-like carbon (Cfa), the latter after precipitation of the humic  
13 acid-like carbon (Cha) at pH 2.0 (Bustamante et al., 2012). The Cha was calculated by  
14 subtracting the Cfa from the Cex.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

### 36 *2.3 Thermal analysis*

37 To carry out the thermogravimetric determinations, the sewage sludge samples were  
38 dried in an air stream, ground in an agate mill and sieved through a 0.125 mm mesh.  
39 Thermal analyses were performed with a Mettler Toledo (TGA/SDTA851e/LF/1600).  
40 All samples were combusted with a mixing stream of oxygen/helium (20/80%), a gas  
41 flow 100 ml min<sup>-1</sup> within a temperature range from 25 to 800 °C, a heating rate 20 °C  
42 min<sup>-1</sup> and a sample weight about 15 mg.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

### 55 *2.4. Statistical analysis*

1 The raw data obtained from thermal and chemical analyses were analysed using by the  
2 multivariate method Multidimensional Scaling (MDS) (Wherens, 2011), in order to  
3 reconstruct a low-dimensional map of samples that leads to the same similarity matrix  
4 as the original data. The Sammon functions were used to carry out this method. The  
5 variables considered for the analysis were the following: a) Population equivalent (Pe):  
6 Pe <1000; 1000 <Pe <10,000; 10,000 <Pe <100,000; Pe >100,000; b) Type of treatment  
7 plant: active sludge, biodiscs-biofilters and trickling filters and prolonged oxidation; c)  
8 Type of sludge stabilization: aerobic and anaerobic and d) Uses of the biosolids: direct  
9 application in agriculture, composting, landfill or landfill mixed-agricultural application  
10 and unknown use. This analysis was carried out using the MASS package (R project).  
11 Also, the mean values of each parameter were tested for statistically significant  
12 differences using one-way analysis of variance (ANOVA), considering the following  
13 aspects: a) scale of the treatment plants; b) type of the wastewater treatment and type of  
14 sewage sludge stabilization. Normality and homogeneity of the variances were checked  
15 using the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively, before ANOVA. To compare  
16 the differences, the Tukey’s b-test was used ( $P < 0.05$ ). This analysis was carried out  
17 using the SPSS v. 15.0 statistical software package.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Characteristics of the biosolids

18 In Table 1 are shown the main parameters associated to organic matter of the samples of  
19 biosolids studied, depending on the scale of the treatment plant, the type of treatment  
20 and the type of stabilization. The scale of the treatment plant showed influence in  
21 practically all the parameters studied, finding the highest values for the greatest

1 population treated, except for the contents in humic acid-like C (Cha), which seemed  
2 not to be affected by this variable, as it was also reported by Torrecillas et al. (2013).  
3  
4 In case of the type of stabilization (aerobic and anaerobic), the only parameters  
5 influenced were TOC, TOM and the contents in Cfa, being higher in the sewage sludge  
6 samples stabilized in anaerobic conditions. Torrecillas et al. (2013), in a study of  
7 organic matter pools in biosolids of the same area of study also observed greater total  
8 contents of C in anaerobically stabilized biosolids, but this fraction was not in available  
9 forms such as water-soluble or extractable pools. Regarding the type of treatment, this  
10 variable seemed to influence the contents of TKN and of the Cext, Cfa and Cha, the  
11 lowest values being observed in all the parameters for the treatment of biodiscs-  
12 biofilters. Also, in all the sewage sludge samples, the values of the fulvic acid-like  
13 fraction were greater than for the humic acid-like fraction, which coincides with the  
14 results obtained by Moral et al. (2005) in manures. However, comparing this type of  
15 samples with compost samples, Campitelli and Ceppi (2008) and Bustamante et al.  
16 (2010) reported in composts and vermicomposts with different origin, higher contents  
17 of the humic fraction than in the fulvic one, which clearly indicates the greater stability  
18 of these materials compared to biosolids.

### 3.2 Thermal analysis

44 Thermal analysis (TG, DTG and DTA) were carried out in all the samples to assess the  
45 differences in the composition in the sewage sludge samples studied. Figures 1A, 1B  
46 and 1C shows the thermograms of three representative sewage sludge samples (sample  
47 rich in carbohydrates, sample rich in carbonates and sample rich in aliphatic  
48 compounds, respectively). The combustion of the samples was produced with  
49 increasing temperature and with associated mass losses, which were observed in the TG  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 and DTG curves. Notable differences were observed in the corresponding curves,  
2 mainly showed in the loss of mass, indicating important differences in the organic  
3 matter characteristics. The curves of the first sample (Figure 1A) did not show a  
4 significant loss of mass at temperatures below 700 °C, which it seems to indicate that  
5 the material was poor in heat-labile compounds. In the TG curves, the range of  
6 temperatures between 25-175 °C can be attributed to water volatilization (Zhao et al.,  
7 2013), while the weight loss in the range between 175 °C and 400 °C can be attributed  
8 to the combustion of volatile compounds (Li et al., 2015); between 175 °C and 300 °C,  
9 involves the combustion of biodegradable small-molecule organic compounds, while in  
10 the range between 300 °C and 400 °C, the combustion of macromolecule organic matter  
11 (Barneto et al., 2009). At temperature values higher than 700 °C, mass loss is mainly  
12 due to the degradation of carbonates (Folgueras et al., 2013).  
13  
14 On the contrary, the curves of the second sample (Figure 1.B) displayed important mass  
15 losses at temperature values below 400 °C. This may indicate that these samples could  
16 be rich in carbohydrate compounds, such as cellulose, since the mass losses in the range  
17 of 200-400 °C could be attributed to the combustion of carbohydrate rich materials, such  
18 as cellulose, hemicellulose or lignin (Ali et al., 2012). The third sample seemed to be  
19 rich in carbohydrates and in aliphatic material. The range of 400-600 °C  
20 corresponds in the DTG curves with the combustion of fixed carbon (Li et al., 2015).  
21 The differences between samples indicate a very wide range in the composition of the  
22 organic material. As it is shown in Figure 1, the samples can be composed by different  
23 proportions of carbohydrate molecules, aliphatic materials or inorganic carbonate.  
24  
25 Considering the potential agricultural use of these materials, the incorporation of  
26 sewage sludge rich in aliphatic materials could influence some properties of soils, since  
27 within this aliphatic fraction, lipids constitute an important percentage. These  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 compounds reduce the water retention capacity of amended soils, but also have an  
2 influence on the soil structural stability, showing a positive effect on the soil  
3 aggregation and the aggregate stability, and on the biodegradation–humification balance  
4 in soils (Réveillé et al., 2003). On the other hand, sludge samples rich in easily  
5 degradable substances, such as carbohydrates, can produce a large increase in the soil  
6 microbial activity, which implies an increased consumption of oxygen that in some  
7 circumstances can lead to anaerobic conditions and fermentation processes, with  
8 production of phytotoxic substances (Wu et al., 2000). Therefore, considering the  
9 potential agricultural use of these materials, the most important aspect is not the total  
10 content in organic matter or the high content in carbonate in the sludge, but the nature of  
11 this organic matter. So, it is essential to find a parameter that allows to estimate the  
12 amount of carbohydrates in the sample, in relation to the quantity of aliphatic material.  
13 The R1 index intends to express the relative amount in weight (TG) of the more  
14 thermally stable fraction of organic matter with respect to the less stable one  
15 (Dell’Abate et al., 2000). Therefore, this index can be used in order to evaluate the  
16 degree of stability of the organic matter in the sludge. The R1 can be calculated as the  
17 relation of the mass loss in the region of the aliphatic materials (between 430 to 600   C)  
18 and the mass loss in the carbohydrate molecules (between 200 to 430   C) during the  
19 combustion process. Values of R1 below 0.5 would be indicative of high levels of  
20 carbohydrates. On the contrary, values of R1 very over 0.5 would indicate high levels of  
21 aliphatic materials. In Figure 2, it is shown the R1 values of the sludge samples. The  
22 value of R1 changed between minimal values of 0.18 and maximums of 0.85, indicating  
23 the different degree of stability of the samples of biosolids studied.

24 Another portion of the data was constituted by DTA analysis (Fig. 3). As it has  
25 previously commented, the mass loss of the sample associated with the first exothermic  
26

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

peak in the range 200-430 °C, reflects the cellulosic nature, while the mass loss in the temperature range 430-600 °C, associated with a second exothermic peak, is attributed to more complex molecules, such as aliphatic material. Above these temperatures, mass loss corresponds to inorganic material (carbonates). DTA curves showed the increase in temperatures by an exothermic process, such as the combustion of the organic matter (carbohydrates and aliphatic materials) (Figures 3A, 3B and 3C), showing clearly the diverse nature of the organic matter present in the different sewage sludge samples.

Comparing the DTA curves with the R1 values, for the sample rich in carbohydrates was of 0.195, for the sample rich in carbonates was of 0.412 and for the sample rich in aliphatic materials was of 0.775. Also, it was possible to calculate an alternative R1 using the area above the DTA curve, obtaining values of 0.385, 0.403 and 6.936 for the same samples, respectively. Therefore, with the aim to minimize the possible environmental negative impacts of the application of sludge to soils, both in agricultural use or in regeneration of degraded soils, the value of R1 should be higher than 0.6. Also, the alternative R1 calculated with the DTA data could be also considered, before taking the decision of the sludge destination.

In Figure 3, it is also showed the percentage of the energy released in relation to the temperature, in order to indicate the energy that would be available for the microorganisms during the process of transformation and stabilization of the organic matter. These data have been obtained integrating the data from the DTA curves (Otero et al., 2002). In certain samples, it has been found that the energy of the least resistant fraction of organic matter (the organic matter that burns below 500 °C) supposed 92 % of the total energy (sample rich in carbohydrates), while in the sample with the highest amount in carbonates and poor in organic matter, the quantity of energy was about 83

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

%). However, in the sample rich in more resistant materials, the energy obtained below 500 °C was only around 29 %.

### 3.3 Chemometric analysis

As it has been previously observed, thermal analysis provides an excellent characterization of the nature of the organic present matter in the sewage sludge samples. On the basis of this composition, it is more accurate to decide the final destination of the sludge. Nevertheless, it is also essential to decide the best treatment of the sludge. The treatment will be determined both for the characteristics of the treatment plant and for the final use of the material. Then, to simplify the results obtained, the data from the TG, DTG and DTA were analysed by MDS. The changes of the thermal behaviour in the sludge samples can be visualised using the Sammon mapping (Whereens, 2011). With Sammon mapping can be minimized the influence of large distances, which could dominated the map. The score data were displayed in Figure 4. The scores were labelled according to the different variables that affect the nature of the final product: A) Type of treatment plant; B) Population equivalent; C) Type of sludge stabilization; and, C) Use of the sludge. The scores were grouped according to all the considered variables. As it can be observed in Figure 4, the most clear classification of the scores of the samples were obtained according to the type of treatment considered (active sludge, biodiscs-biofilters and trickling filters or prolonged oxidation) (Fig. 4A). Then, this shows that with the obtained model could be possible, through a thermal analysis, to identify the treatment that has been applied to the sludge. And what is more important, this would allow to design the different plants for the best treatment of the sludge to obtain the end product more suitable for the destination and/or use considered.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

This can be a key aspect to optimise the use of sewage sludge in agriculture, avoiding the risks associated to an unsuitable material.

#### **4. Conclusions**

In conclusion, the organic matter from sludge showed a great variability related to its treatment (influent nature, sewerage treatment, stabilization processes, etc.). Thermal analysis also reflected this variability in the organic matter composition. However, the combination of thermal analysis and chemometric approaches, such as MDS, makes possible to classify the sludge samples in different groups, which could help in the decision making related to sludge management, especially to optimize the agronomic use and minimize the environmental risks. However, more research is needed concerning the combined used of these tools to confirm the promising results obtained.

#### **5. Acknowledgements**

This work has been financed by the Spanish Ministry of Science and Innovation (currently of Economy and Competitiveness) and European Regional Development Funds (ERDF) (AGL2009-12371-C02-01), by the Generalitat Valenciana (ACOMP/2010/177) and also by the University of Alicante (UAUSTI09-08) Project.

#### **6. References**

Adani, F., Confalonieri, R., Tambone, F., 2004. Dynamic respiration index as a descriptor of the biological stability of organic wastes. *J. Environ. Qual.* 33, 1866-1876. *Agric. Ecosyst. Environ.* 158, 41-48.

1  
2 Ali, M.; Bhatia, A.; Kazmi, A.A., Ahmed, N. Characterization of high rate composting  
3 of vegetable market waste using Fourier transform-infrared (FT-IR) and thermal studies  
4 in three different seasons. *Biodegradation* 2012, 23, 231–242.  
5  
6 Baffi, C., Dell’abate, M.T., Nassisi, A., Silva, S., Benedetti, A., Genevini, P.L., Adani,  
7 F., 2007. Determination of biological stability in compost: a comparison of  
8  
9 methodologies. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1284-1293.  
10  
11 Barneto, A.G., Carmona, J.A., Martin, J.E., Blanco, J.D., 2009. Kinetic models based in  
12 biomass components for the combustion and pyrolysis of sewage sludge and its  
13  
14 compost. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 86, 108–114.  
15  
16 Bustamante, M.A., Alburquerque, J.A., Restrepo, A.P., de la Fuente, C., Paredes, C.,  
17  
18 Moral, R., Bernal, M.P., 2012. Co-composting of the solid fraction of anaerobic  
19 digestates, to obtain added-value materials for use in agriculture. *Biomass Bioenerg.* 43,  
20  
21 26-35.  
22  
23 Bustamante, M.A., Suárez-Estrella, F., Torrecillas, C., Paredes, C., Moral, R., Moreno,  
24  
25 J., 2010. Use of chemometrics in the chemical and microbiological characterization of  
26  
27 composts from agroindustrial wastes. *Bioresour. Technol.* 101, 4068-4074.  
28  
29 Campitelli, P., Ceppi, S., 2008. Effects of composting technologies on the chemical and  
30  
31 physicochemical properties of humic acids. *Geoderma* 144, 325–333.  
32  
33 Dell’Abate, M.T., Benedetti, A., Sequi, P., 2000. Thermal methods of organic matter  
34  
35 maturation monitoring during a composting process. *J. Therm. Anal. Calorim.* 61, 389-  
36  
37 396.  
38  
39 Fernández, J.M., Plaza, C., Polo, A., Plante, A.F., 2012. Use of thermal analysis  
40  
41 techniques (TG–DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste  
42  
43 streams to predict biological stability prior to land application. *Waste Manage.* 32, 158-  
44  
45 164.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2 Folgueras, M.B., Alonso, M., Díaz, R.M., 2013. Influence of sewage sludge treatment  
3 on pyrolysis and combustion of dry sludge. *Energy* 55, 426-435.  
4  
5 Galvez-Sola, L., Moral, R., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa, A., Bustamante,  
6  
7 M.A., Martinez-Sabater, E., Paredes, C., 2010. The potential of near infrared reflectance  
8  
9 spectroscopy (NIRS) for the estimation of agroindustrial compost quality. *Sci. Total*  
10  
11 *Environ.* 408, 14114-1421.  
12  
13 Gómez, X., Diaz, M.C., Cooper, M., Blanco, D., Morán, A., Snape, C.E., 2007. Study  
14  
15 of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric  
16  
17 analysis and <sup>13</sup>C NMR. *Chemosphere* 68, 1889-1897.  
18  
19 Grube, M., Lin, J. G., Lee, P. H., Kokorevicha, S., 2006. Evaluation of sewage sludge-  
20  
21 based compost by FT-IR spectroscopy. *Geoderma* 130, 324–333.  
22  
23  
24 Li, M., Xiao, B., Wang, X., Liu, J., 2015. Consequences of sludge composition on  
25  
26 combustion performance derived from thermogravimetry analysis. *Waste Manage.* 35,  
27  
28 141-147.  
29  
30  
31 Li, X., Xing, M., Yang, J., Zhao, L., Dai, X., 2013. Organic matter humification in  
32  
33 vermifiltration process for domestic sewage sludge treatment by excitation–emission  
34  
35 matrix fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Hazard. Mater.* 261,  
36  
37 491-499.  
38  
39  
40 Magdziarz, A., Werle, S., 2014. Analysis of the combustion and pyrolysis of dried  
41  
42 sewage sludge by TGA and MS. *Waste Manage.* 34, 174-179.  
43  
44  
45 Milinovic, J., Vidal, M., Lacorte, S., Rigo, A., 2014. Leaching of heavy metals and  
46  
47 alkylphenolic compounds from fresh and dried sewage sludge. *Environ. Sci. Pollut.*  
48  
49 *Res.* 21, 2009-2017.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Mondini, C., Dell'Abate, M.T., Leita, L., Benedetti, A., 2003. An integrated chemical, thermal, and microbiological approach to compost stability evaluation. *J. Environ. Qual.* 32 (6), 2379-2386.

Moral, R., J. Moreno-Caselles, M. D. Pérez-Murcia, A. Pérez-Espinosa, Rufete, B., Paredes, C., 2005. Characterisation of the organic matter pool in manures. *Bioresour. Technol.* 96, 153-158.

Otero, M., Calvo, L.F., Estrada, B., García, A.I., Morán, A., 2002. Thermogravimetry as a technique for establishing the stabilization progress of sludge from wastewater treatments plants. *Thermochim. Acta* 389, 121-132.

Plante, A.F., Fernández, J.M., Leifeld, J., 2009. Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma* 153, 1-10.

Provenzano, M., Ouattmane, A., Hafidi, M., Senesi, N., 2000. Differential scanning calorimetric analysis of composted materials from different sources. *J. Therm. Anal. Calorim* 61, 607-614.

Réveillé, V., Mansuy, L., Jardé, E., Garnier-Sillam, E., 2003. Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry* 34, 615-627.

Roig, N., Sierra, J., Marti, E., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2012. Long-term amendment of Spanish soil with sewage sludge: effects on soil functioning.

Seggiani, M., Puccini, M., Raggio, G., Vitolo, S., 2012. Effect of sewage sludge content on gas quality and solid residues produced by cogasification in a updraft gasifier. *Waste Manage.* 32, 1826-1834.

Smidt, E., Lechner, P., Schwanninger, M., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., 2002. Characterization of waste organic matter by FT-IR spectroscopy: application in waste science. *Appl. Spectrosc.* 56, 1170-1175.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Torrecillas, C., Martínez-Sabater, E., Gálvez-Sola, L., Agulló, E., Pérez-Espinosa, A.,  
Morales, J., Mayoral, A.M., Moral, R., 2013. Study of the organic fraction in biosolids.  
Commun. Soil Sci. Plan. 44 (1-4), 492-501.

Wang, X., Chen, T., Ge, Y., Jia, Y., 2008. Studies on land application of sewage sludge  
and its limiting factors. J. Hazard. Mater. 160 (2-3), 554-558.

Wehrens, R., 2011. Chemometrics with R. Multivariate data analysis in the natural  
sciences and life sciences. Springer-Verlag, Berlin.

Werle, S., Wilk, R.K., 2010. A review of methods for the thermal utilization of sewage  
sludge: the Polish perspective. Renew. Energ. 35, 1914-1919.

Wu, L., Ma, L.Q., Martinez, G.A., 2000. Comparison of methods for evaluating stability  
and maturity of biosolids compost. J. Environ. Qual 29, 424-429.

Zbytniewski, R., Buszewski, B., 2005. Characterization of natural organic matter  
(NOM) derived from sewage sludge compost, part 1: Chemical and spectroscopic  
properties. Bioresour. Technol. 96, 471-478.

Zhao, P., Ge, S., Yoshikawa, K., 2013. An orthogonal experimental study on solid fuel  
production from sewage sludge by employing steam explosion. Appl. Energy 112,  
1213-1221.

Figure  
Click here to download Figure: Figure 1.doc

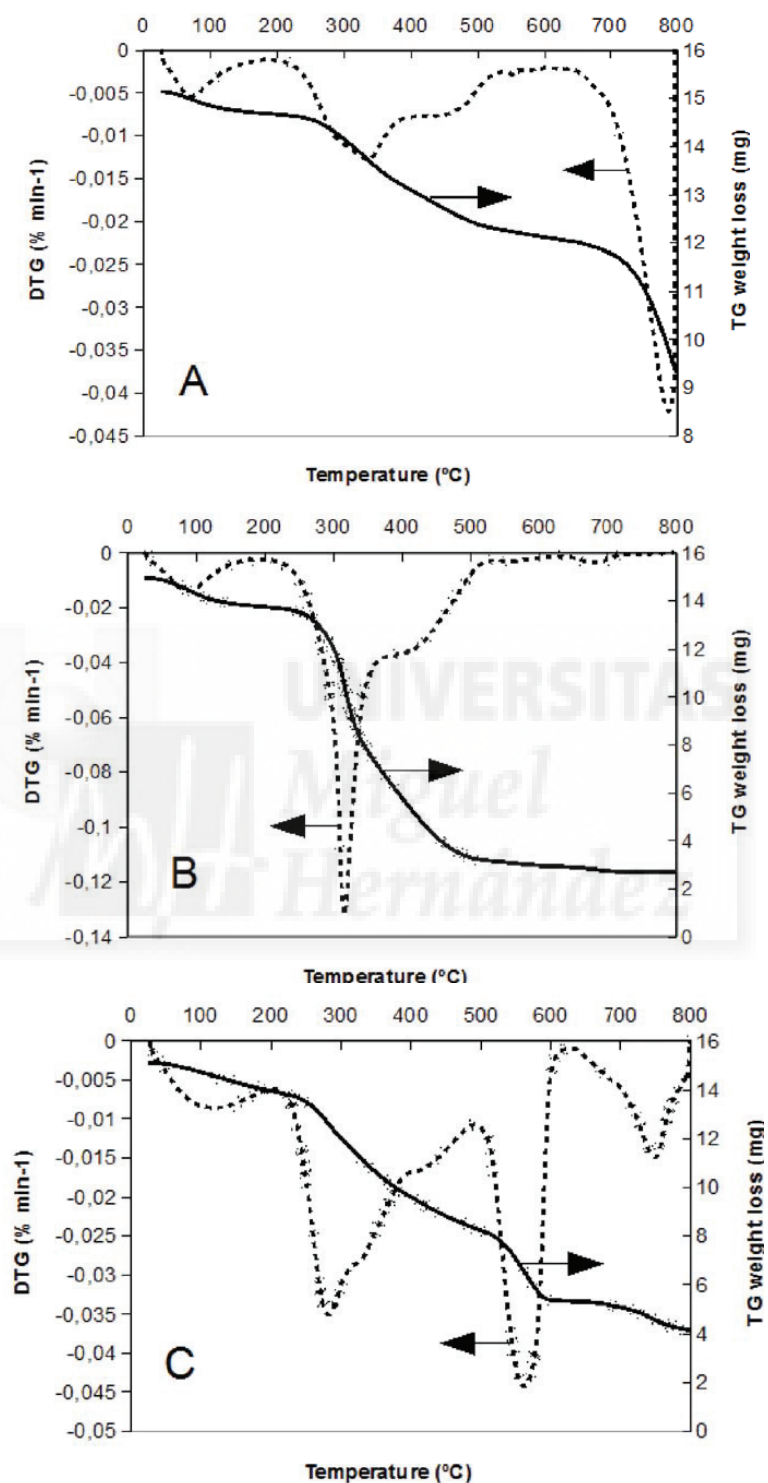


Figure 1

Figure  
[Click here to download Figure: Figure 2.doc](#)

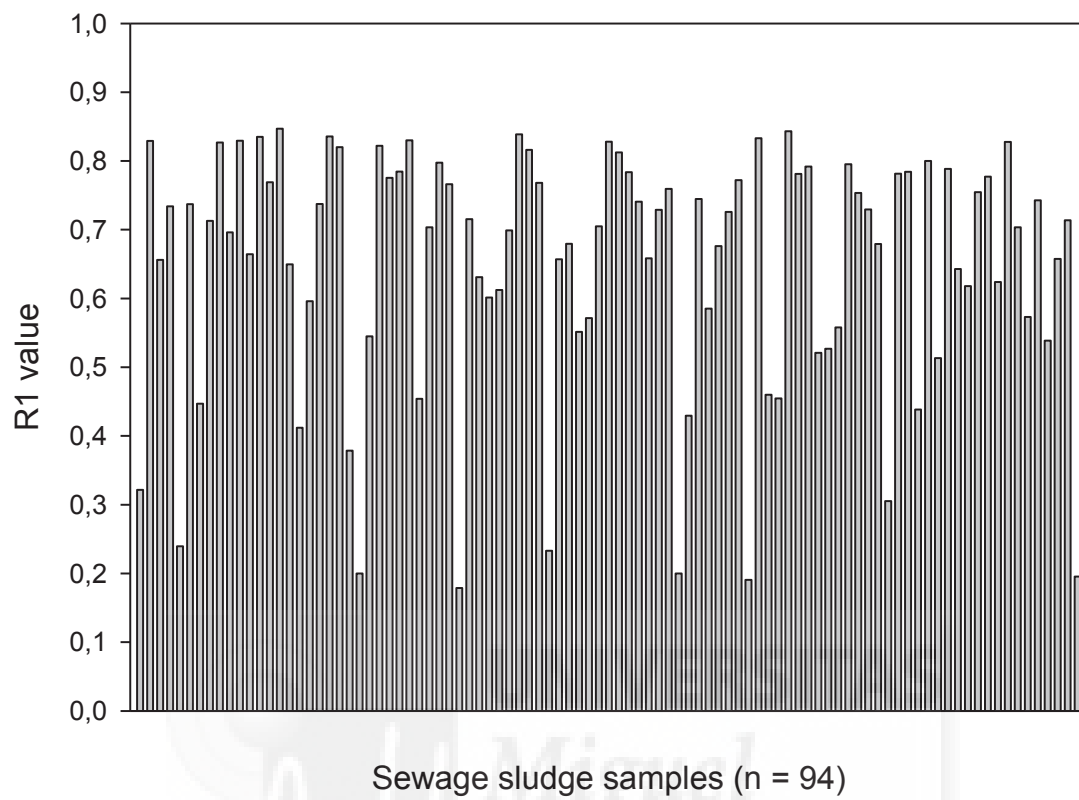


Figure 2

Figure  
[Click here to download Figure: Figure 3.doc](#)

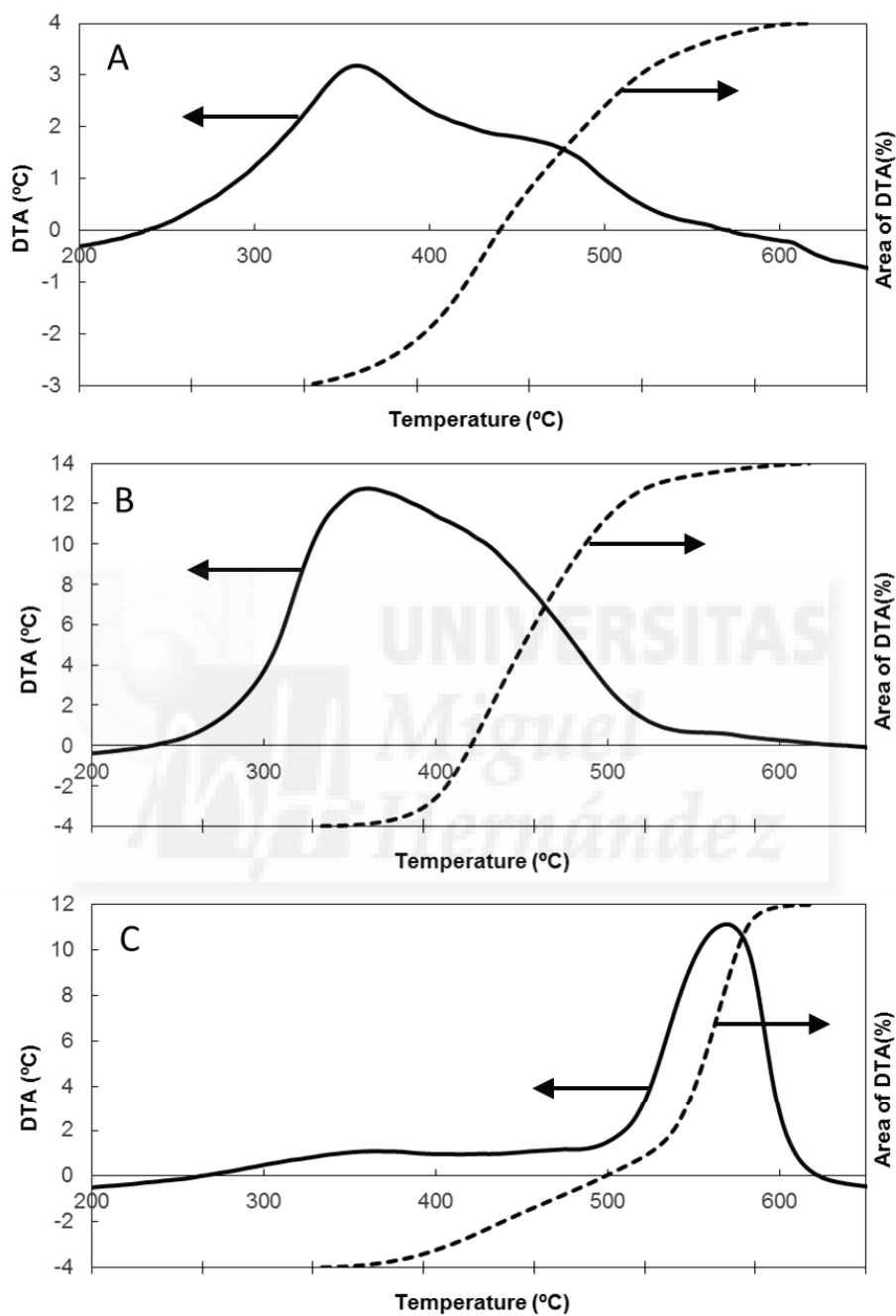


Figure 3



Figure  
[Click here to download Figure: Figure 4.doc](#)

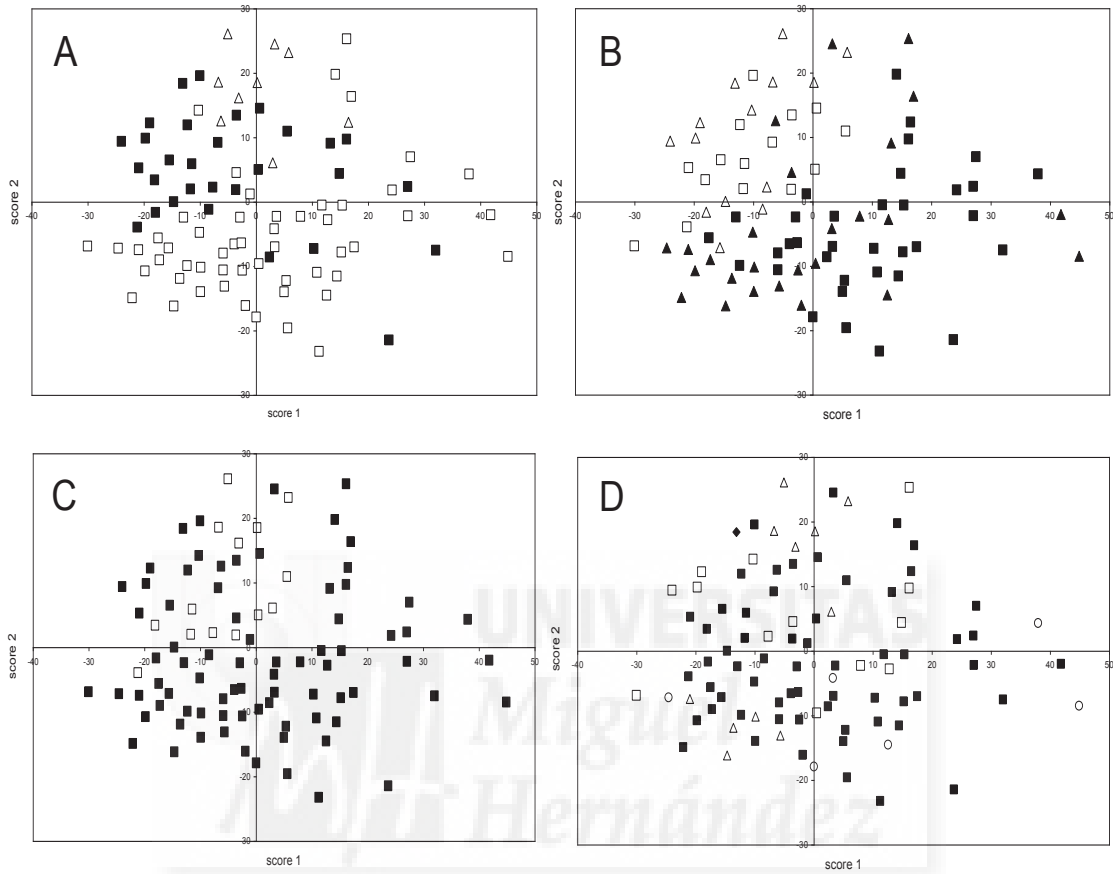


Figure 4.

## Figure

[Click here to download Figure: Figure captions.doc](#)

### Figure captions

**Figure 1.** TG (dashed line) and DTG (continuous line) curves of three representative sewage sludge samples: A) sample rich in carbohydrates; B) sample rich in carbonates; C) sample rich in aliphatic materials.

**Figure 2.** Variations in the values of the R1 parameter of the sewage sludge samples.

**Figure 3.** DTA (continuous line) and percentage of energy release (dashed line) curves of three representative sewage sludge samples: A) sample rich in carbohydrates; B) sample rich in carbonates; C) sample rich in aliphatic materials.

**Figure 4.** Multidimensional scaling approaches on the scores thermal analysis data obtained from the sludge samples: A) Type of treatment plant, with sewage sludge from three types of wastewater treatment plants using aerobic biological processes. (■) active sludge, (△) biodiscs-biofilters and trickling filters and (□) prolonged oxidation. B) Population equivalent (Pe). (■)  $Pe < 1000$ , (▲)  $1000 < Pe < 10,000$ , (□)  $10,000 < Pe < 100,000$ , (△)  $100,000 < Pe$ . C) Type of sewage sludge stabilization. (■) aerobic and (□) anaerobic. D) Use of sewage sludge. (■) Direct application in agriculture, (□) composting, (△) landfill, (○) landfill mixed-agricultural application, and (♦) unknown use.

Table 1. Main characteristics of the samples of biosolids studied depending on the wastewater treatment conditions considered (scale of the treatment plant, type of stabilization and type of treatment).

|         | Treatment plant scale |                  |                     |             |             | Type of stabilization |           |       | Type of treatment |        |  |
|---------|-----------------------|------------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------|-----------|-------|-------------------|--------|--|
|         | Pe <1000              | 1000 <Pe <10,000 | 10,000 <Pe <100,000 | Pe >100,000 | Pe >100,000 | Aerobic               | Anaerobic | AS    | BB                | PO     |  |
| TOM (%) | 47.3a                 | 52.1ab           | 57.1b               | 58.2b       | 58.2b       | 51.0a                 | 58.8b     | 54.0a | 51.7a             | 51.0a  |  |
| TOC (%) | 28.3a                 | 32.7a            | 38.7b               | 40.0b       | 40.0b       | 32.3a                 | 38.4b     | 36.2a | 36.1a             | 31.0a  |  |
| WSC (%) | 2.20a                 | 4.07ab           | 4.43ab              | 6.31b       | 6.31b       | 3.76a                 | 3.89a     | 4.90a | 2.76a             | 3.27a  |  |
| TKN (%) | 4.05a                 | 4.58ab           | 5.21b               | 5.42b       | 5.42b       | 4.57a                 | 4.87a     | 5.00b | 3.29a             | 4.59b  |  |
| WSN (%) | 0.45a                 | 0.91ab           | 1.07bc              | 1.47c       | 1.47c       | 0.86a                 | 0.79a     | 1.12a | 0.49a             | 0.75a  |  |
| Cex (%) | 6.10a                 | 7.39ab           | 7.92ab              | 9.37b       | 9.37b       | 7.29a                 | 7.39a     | 8.11b | 5.21a             | 7.12ab |  |
| Cfa (%) | 4.40a                 | 5.58ab           | 6.08b               | 7.15b       | 7.15b       | 5.47a                 | 5.40b     | 6.14b | 4.06a             | 5.26ab |  |
| Cha (%) | 1.70a                 | 1.80a            | 1.84a               | 2.23a       | 2.23a       | 1.81a                 | 1.98a     | 1.97a | 1.15a             | 1.86a  |  |

Pe: population equivalent; AS: active sludge; BB: biodiscs-biofilters and trickling filters; PO: prolonged oxidation.

TOM: total organic matter; TOC: total organic carbon; WSC: water-soluble carbon; TKN: total Kjeldahl nitrogen; WSN: water-soluble nitrogen;

Cex: extractable organic carbon; Cfa: fulvic acid-like carbon; Cha: humic acid-like carbon.

Average values in a row followed by the same letter are not significantly different at  $P < 0.05$  (Tukey-b test).



### Publicación 3.3

---

**CHEMICAL, THERMAL AND SPECTROSCOPIC METHODS TO ASSESS BIODEGRADATION OF  
WINERY-DISTILLERY WASTES DURING COMPOSTING.**

A. Torres-Climent, P. Gomis, J. Martín-Mata, M.A. Bustamante, F.C. Marhuenda-Egea, M.D.  
Pérez-Murcia, A., Pérez-Espinosa, C. Paredes, R. Moral

*PLoS ONE 10(9): e0138925. doi:10.1371/journal.pone.0138925*



RESEARCH ARTICLE

# Chemical, Thermal and Spectroscopic Methods to Assess Biodegradation of Winery-Distillery Wastes during Composting

A. Torres-Climent<sup>1</sup>, P. Gomis<sup>1</sup>, J. Martín-Mata<sup>1</sup>, M. A. Bustamante<sup>1\*</sup>, F. C. Marhuenda-Egea<sup>2</sup>, M. D. Pérez-Murcia<sup>1</sup>, A. Pérez-Espinosa<sup>1</sup>, C. Paredes<sup>1</sup>, R. Moral<sup>1</sup>

**1** Department of Agrochemistry and Environment, Miguel Hernandez University, Orihuela, Alicante, Spain, **2** Department of Agrochemistry and Biochemistry, University of Alicante, Alicante, Spain

\* [marian.bustamante@umh.es](mailto:marian.bustamante@umh.es)



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** Torres-Climent A, Gomis P, Martín-Mata J, Bustamante MA, Marhuenda-Egea FC, Pérez-Murcia MD, et al. (2015) Chemical, Thermal and Spectroscopic Methods to Assess Biodegradation of Winery-Distillery Wastes during Composting. PLoS ONE 10(9): e0138925. doi:10.1371/journal.pone.0138925

**Editor:** Jorge Aburto, INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO, MEXICO

**Received:** April 26, 2015

**Accepted:** September 4, 2015

**Published:** September 29, 2015

**Copyright:** © 2015 Torres-Climent et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by a contract to MABM, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i) 2008-2011), co-funded by the EU through the Social Funds (contract reference PTQ-12-05655). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The objective of this work was to study the co-composting process of wastes from the winery and distillery industry with animal manures, using the classical chemical methods traditionally used in composting studies together with advanced instrumental methods (thermal analysis, FT-IR and CPMAS <sup>13</sup>C NMR techniques), to evaluate the development of the process and the quality of the end-products obtained. For this, three piles were elaborated by the turning composting system, using as raw materials winery-distillery wastes (grape marc and exhausted grape marc) and animal manures (cattle manure and poultry manure). The classical analytical methods showed a suitable development of the process in all the piles, but these techniques were ineffective to study the humification process during the composting of this type of materials. However, their combination with the advanced instrumental techniques clearly provided more information regarding the turnover of the organic matter pools during the composting process of these materials. Thermal analysis allowed to estimate the degradability of the remaining material and to assess qualitatively the rate of OM stabilization and recalcitrant C in the compost samples, based on the energy required to achieve the same mass losses. FT-IR spectra mainly showed variations between piles and time of sampling in the bands associated to complex organic compounds (mainly at 1420 and 1540 cm<sup>-1</sup>) and to nitrate and inorganic components (at 875 and 1384 cm<sup>-1</sup>, respectively), indicating composted material stability and maturity; while CPMAS <sup>13</sup>C NMR provided semi-quantitatively partition of C compounds and structures during the process, being especially interesting their variation to evaluate the biotransformation of each C pool, especially in the comparison of recalcitrant C vs labile C pools, such as Alkyl/O-Alkyl ratio.

## Introduction

Currently, the European Union (EU-27) is the world's leader in the wine sector, with 55% of the global vineyard and around 60% of wine production, France, Italy and Spain being the largest world wine producing countries [1], which implies a great generation of wastes, whose

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

disposal and recycling constitute an environmental problem. Grape marc (GM) and exhausted grape marc (EGM) constitute some of the main solid wastes generated. According to the Council Regulation (EC) No 491/2009 on the common organization of agricultural markets and on specific provisions for certain agricultural products, GM, the primary waste of wine production obtained after the pressing process, is considered a by-product and must be sent to alcohol distilleries to extract alcohol and tartrates, producing a solid waste, exhausted grape marc (EGM), obtained after the grape marc-washing processes [2].

Several alternatives have been proposed to recycle these wastes and thus, minimize the potential environmental risk associated to their disposal, which include simple options, such as the use for feedstuff production, and advanced treatments to obtain added-value products (grape seed oil, polyphenolic compounds) or energy [2,3]. However, the obtaining of different substances from these wastes depends on the market value of the obtained products related to the management of the waste from the winemaking process. Moreover, in most of the previous treatments (except the production of feedstuff or energy), the amount of remained waste is close to that prior to be treated.

Composting is a widely used technology to transform residual organic matter, with a significant reduction of volume and weight during the process, in a sanitized, stabilized and mature product, easy to store and marketable as organic amendment or fertilizer [4]. Therefore, the composting of the winery-distillery wastes can constitute a feasible option not only to manage these wastes, but also to recycle them, as it has been reported by different authors [5, 6]. However, more studies have been carried about the co-composting of the winery-distillery wastes with other organic residues, such as agroindustrial wastes [7], animal manures [8, 9] and urban wastes [9, 10]. Although these authors have reported the composting of winery wastes, enough attention has not been put onto organic matter changes and the composting process itself. In this complex biological aerobic system, it is essential to obtain an in-depth understanding of the organic matter transformations, in order to optimize the composting process and the later application of the compost obtained [11]. This is especially important when specific waste fluxes are considered, such as the winery-distillery wastes and their potential synergies with manures as co-composting ingredients.

Currently, there is a clear consensus about the absence of one specific parameter to ascertain stability, maturity and /or quality in compost using an only technique, due to the high variability observed in the composts, since their characteristics strongly depend on the raw material and the composting system used [12]. This fact is especially notable in certain materials, such as the winery-distillery wastes. These materials usually show an anomalous trend of the humification indices (usual parameters considered to evaluate the process development) during composting, when the classical and non-specific analytical methods are used [8]. Therefore, one of the best solutions to avoid this could be the knowledge of the overall process and of the evolution of organic matter [13]. So, the combination of classical techniques and advanced instrumental methods can provide more conclusive information about the process [14]. In this sense, the thermal and spectroscopic techniques show some advantages compared to the classical analytical methods, usually time-consuming and that require complex sample preparations and/or specific reactants [15].

The instrumental techniques used in this work (thermal analysis, FT-IR and CPMA<sup>13</sup>C NMR techniques) were selected due to their efficiency for the characterization of the organic matter pools in different organic materials, especially composts. Thermal decomposition analyses, including thermogravimetry (TG), derivative thermogravimetry (DTG) and differential thermal analysis (DTA) have been reported as useful tools for structural and chemical assessment of natural organic matter [16, 17, 18,19]. Comparative mass loss analysis between samples during composting can inform about the changes into the complexity of organic matter



structures [16]. Moreover, correlation of DTG profiles and time variation in samples can help to identify specific types and organic matter transformations [17, 19].

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) constitutes a useful technique to study the development of the composting process, since it can help in the qualitative characterization of the principal chemical groups of the raw organic matter [20, 21, 22]. With FT-IR spectra, the relative intensity of the typical bands of components can be selected and used to follow the composting process, monitoring the transformation of the organic and inorganic materials.

Solid-state  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectroscopy (solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR) constitutes one of the most powerful tools for studying the carbon composition of organic matter [21], since this technique allows to investigate samples without any need of extraction and fractionation and thus, to collect direct information on the structural characteristic of whole organic matter during the composting process [23]. So, several studies have proposed the cross-polarization and magic angle spinning (CPMAS)  $^{13}\text{C}$  NMR technique for monitoring the stabilization process during composting, analyzing the complete sample and the extracted humic acids [13, 19, 23].

Therefore, the main aim of this work was to study the development of the co-composting process of winery-distillery wastes with animal manures using the traditional analytical methods together with advanced instrumental methods (thermal analysis, FT-IR and CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR techniques) to ascertain organic matter changes during the process. The quality assessment of the final composts obtained was also carried out.

## Materials and Methods

### Compost procedure

Three different piles (A, B and C) were prepared by mixing wastes from the winery and distillery industry (grape marc (GM) and exhausted grape marc (EGM)), with two different animal manures (cattle manure (CM) and poultry manure (PM)). GM was obtained from a winery placed in Bullas (Murcia, Spain), EGM was collected from an alcohol distillery placed in Villarrobledo (Albacete, Spain); CM was obtained from a cattle farm in Santomera (Murcia, Spain) and PM was collected from a poultry farm of laying hens located in Orihuela (Alicante, Spain). The main characteristics of the raw materials are shown in Table 1.

Then, the raw materials were thoroughly mixed, and each mixture obtained (about 150 kg) was separately placed in thermo-composters with an efficient volume of 350 L. The thermo-composters, 70 cm x 70 cm x 85 cm, were made of high-density polyethylene (HDPE) and have a lateral system of natural ventilation to guarantee aerobic conditions. The moisture of the piles was controlled weekly by adding the necessary amount of water to obtain a moisture content not less than 40%.

In order to compost the maximum weight of winery-distillery wastes with a sufficient amount of animal waste, as nitrogen and micro-organisms source, the composting mixtures were prepared on a dry weight basis (fresh weight basis in brackets) in the following proportions:

Pile A : 76% EGM + 24% CM [70 : 30]; C/N ratio = 21.9

Pile B : 72% GM + 28% CM [70 : 30]; C/N ratio = 21.1

Pile C : 67% EGM + 33% PM [70 : 30]; C/N ratio = 14.6

The mixtures were composted in the thermo-composters by the turning composting system. The piles were turned six times, when the temperature in the mixtures decreased, to provide aeration. The bio-oxidative phase of composting was considered finished when the

**Table 1. Main physico-chemical and chemical characteristics of the raw materials used in the composting piles (dry matter basis).**

|                              | EGM         | GM          | CM          | PM          |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| pH                           | 6.22 ± 0.01 | 4.36 ± 0.01 | 9.92 ± 0.02 | 7.50 ± 0.01 |
| EC (dS m <sup>-1</sup> )     | 1.46 ± 0.04 | 3.32 ± 0.02 | 7.28 ± 0.01 | 6.75 ± 0.06 |
| OM (%)                       | 91.9 ± 0.1  | 92.4 ± 0.0  | 70.3 ± 0.2  | 65.2 ± 0.5  |
| TOC (%)                      | 49.3 ± 0.35 | 50.9 ± 0.14 | 32.7 ± 0.21 | 31.4 ± 0.4  |
| TN (%)                       | 2.04 ± 0.01 | 1.78 ± 0.04 | 3.36 ± 0.01 | 4.57 ± 0.01 |
| C/N ratio                    | 24.2 ± 0.1  | 28.6 ± 1.1  | 9.73 ± 0.15 | 6.87 ± 0.17 |
| WSC (%)                      | 3.22 ± 0.02 | 4.07 ± 0.05 | 3.95 ± 0.01 | 4.74 ± 0.04 |
| WSPOL (mg kg <sup>-1</sup> ) | 536 ± 5     | 1041 ± 12   | 3521 ± 23   | 8360 ± 40   |
| P (g kg <sup>-1</sup> )      | 1.45 ± 0.20 | 1.03 ± 0.01 | 8.92 ± 0.32 | 9.60 ± 0.18 |
| K (g kg <sup>-1</sup> )      | 6.1 ± 0.1   | 19.3 ± 0.1  | 27.4 ± 0.3  | 28.5 ± 0.1  |
| Ca (g kg <sup>-1</sup> )     | 15.9 ± 0.2  | 10.9 ± 0.4  | 96.0 ± 0.7  | 104 ± 1.1   |
| Mg (g kg <sup>-1</sup> )     | 1.20 ± 0.03 | 1.60 ± 0.02 | 15.4 ± 0.02 | 7.54 ± 0.06 |
| Na (g kg <sup>-1</sup> )     | 0.27 ± 0.01 | 0.28 ± 0.00 | 16.3 ± 0.01 | 4.07 ± 0.02 |
| Fe (mg kg <sup>-1</sup> )    | 624 ± 3     | 719 ± 9     | 1600 ± 14   | 171 ± 5     |
| Mn (mg kg <sup>-1</sup> )    | 20.2 ± 0.8  | 17.2 ± 1.0  | 329 ± 11    | 279 ± 6     |
| Cu (mg kg <sup>-1</sup> )    | 16.9 ± 0.1  | 19.0 ± 0.1  | 44.0 ± 0.2  | 47.0 ± 0.4  |
| Zn (mg kg <sup>-1</sup> )    | 17.7 ± 0.2  | 18.3 ± 0.1  | 362 ± 3     | 264 ± 7     |

EGM: exhausted grape marc; GM: grape marc; CM: cattle manure; PM: poultry manure. EC: electrical conductivity; OM: organic matter; TOC: total organic carbon; TN: total nitrogen; WSC: water-soluble C; WSPOL: water-soluble polyphenols. Values reported as mean ± standard error (n = 3).

doi:10.1371/journal.pone.0138925.t001

temperature was close to the ambient and re-heating did not occur. Then, composts were left to mature over a period of two months, approximately.

Samples were taken at seven sites of the pile from the whole profile (from the top to bottom). Composite representative samples were obtained after mixing and homogenizing thoroughly the previous seven sub-samples.

Each sample was divided into two fractions: one of them was dried in a drying-oven at 105°C for 24 h to determine the moisture content and the second was air-dried and ground to less than 0.5 mm for the rest of the classical analytical determinations. For the thermal and spectroscopic analyses, composting samples were air-dried, ground in an agate mill, then sieved through a 0.125 mm mesh, and milled again with an agate mortar.

### Classical determinations: chemical analyses

In the raw materials and in the composting samples, EC and pH were analyzed in a 1:10 (w/v) water-soluble extract. Organic matter (OM) was assessed by determining the loss-on ignition at 500°C for 24 h; water-soluble organic carbon (WSC) was determined in a 1:10 (w/v) water extract by using an automatic carbon analyzer for liquid samples (TOC-V CSN Analyzer, Shimadzu).

Total organic C (TOC) and total N (TN) were determined by dry combustion at 950°C using a Leco TruSpec C–N Elemental Analyzer (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA). The humic-like fractions (extractable organic carbon (Cext), fulvic acid-like carbon (Cfa), and humic acid-like carbon (Cha)) were also determined using an automatic carbon analyzer for liquid samples (TOC-V CSN Analyzer, Shimadzu); these extractions were carried out according to the methods used by Bustamante et al. [8]. After HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> digestion, P was assessed colorimetrically as molybdo vanadate phosphoric acid, Na and K were determined by flame photometry (Jenway PFP7 Flame Photometer, Jenway Ltd., Felsted, UK) and Ca, Mg, Fe,

Cu, Mn, Zn by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES, Thermo Elemental Co. Iris Intrepid II XDL, USA). All the analyses were made in triplicate. The germination index (GI) was calculated using seeds of *Lepidium sativum* L. according to the method of Zucconi et al. [24]. The humification indexes (HR, HI, Pha, Cha/Cfa) and the losses of OM (from the initial ( $X_1$ ) and final ( $X_2$ ) ash contents) were calculated according to the equations described by Bustamante et al. [8].

$$\text{Humification ratio (HR)} = 100 \left( \frac{C_{ext}}{C_T} \right)$$

$$\text{Humification index (HI)} = 100 \left( \frac{Cha}{C_T} \right)$$

$$\text{Percentage of humic acids (Pha)} = 100 \left( \frac{Cha}{C_{ext}} \right)$$

$$\text{Polymerisation rate} = \frac{Cha}{Cfa}$$

$$\text{OM loss (\%)} = 100 - 100 \frac{[X_1 (100 - X_2)]}{[X_2 (100 - X_1)]}$$

### Advanced instrumental determinations: thermal and spectroscopic analyses

Thermal analyses were performed with a Mettler Toledo (TGA/SDTA851e/LF/1600) and Pfeiffer Vacuum (Thermostar GSD301T) mass spectrometer that enables the recording of thermograms and mass spectra of combustion gases simultaneously. All samples were combusted with a mixing stream of oxygen/He (20/80%), a gas flow 100 ml min<sup>-1</sup> within a temperature range from 25 to 650°C, a heating rate 10°C min<sup>-1</sup>, a sample weight around 5 mg, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pan, and self-controlled calibration.

The FT-IR spectra were collected on a Bruker IFS 66 spectrometer. The resolution was set to 4 cm<sup>-1</sup>, and the operating range was 400–4000 cm<sup>-1</sup>. The analytical technic used was FT-IR attenuated total reflection spectroscopy (ATR). Samples (7–10 mg) were mixed with 100 mg of dried KBr, and then the mixture was pressed into pellets. In all cases, 20 scans per sample were recorded, averaged for each spectrum, and corrected against the spectrum with ambient air as background.

CPMAS <sup>13</sup>C NMR experiments were performed on a Bruker Advance DRX500 operating at 125.75 MHz for <sup>13</sup>C. Samples were packed into a 4 mm diameter cylindrical zirconia rotor with Kel-F end-caps and spun at 10000 ± 100 Hz. A conventional CPMAS pulse sequence [25] was used with a 1.0 ms contact time. Between 2000 and 5000 scans were accumulated with a pulse delay of 1.5 s. Line broadening was adjusted to 50 Hz. Spectral distributions (the distribution of total signal intensity among various chemical shift ranges) were calculated by integrating the signal intensity in seven chemical shift regions: carbonyl (210–165 ppm), O-aromatic (165–145 ppm), aromatic (145–110 ppm), O<sub>2</sub>-alkyl (110–95 ppm), O-alkyl (95–60 ppm), N-alkyl/methoxy (60–45 ppm), and alkyl (45 to –10 ppm) [26]. The labels only indicate major types of C found in each region. Spin counting calculation were performed using the method of Smernik and Oades [27]. Glycine (analytical reagent grade; SIGMA) was used as an external

intensity standard. The proton spin-lattice relaxation time ( $T_1$ H) and the proton spin-lattice relaxation rate in the rotating frame ( $T_{1\rho}$  H) were determined as described in Smernik and Oades [27]. These parameters are very important in order to avoid signal loss in the CP-1 MAS spectra, since it is possible to choose the best conditions of the CP-MAS pulse sequence (these experimental conditions have been previously described). The percentage of potential  $^{13}\text{C}$  NMR signal, which was actually observed (Cobs), was in the range 60–66% for the CP-MAS technique [27]. The main source of error was uncertainty in the integrated NMR intensities. Two replicate measurements were carried out for all samples.

### Statistical analysis

Data corresponding to OM losses (OM degradation) produced throughout the composting process were fitted to a kinetic function by the Marquardt-Levenberg algorithm to minimize the sum of the squared differences between the observed and predicted values of the dependent variable, using the Sigmaplot 11.0 computer program. A first-order kinetic model was used for OM degradation during composting [28]. This model was chosen as the best fit because it gave a randomized distribution of the residuals together with the lowest residual mean square (RMS) value and a highly-significant F-value (data not shown). The model was:

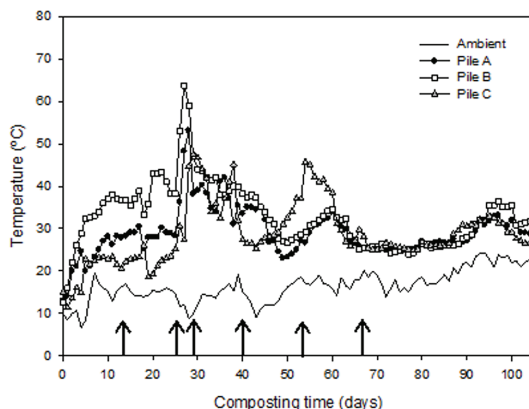
$$\text{OM losses (\%)} = A (1 - e^{-kt});$$

where  $A$  is the maximum degradation of OM (%  $C_T$ ),  $k$  the rate constant ( $\text{d}^{-1}$ ) and  $t$  the composting time (d). The RMS and F-values were calculated to compare the fittings of different functions and the statistical significance of curve fitting. MATLAB version 6.5 from Math-Works was used for the calculations, as well as the iToolbox (including methods for iPLS, biPLS and dynamic biPLS), EMSC Toolbox (for pre-processing methods), and GA-PLS Toolbox, available from <http://www.models.kvl.dk>.

## Results and Discussion

### Temperature evolution of the composting piles

The temperature profile in the composting process determines the rate at which many of the biological reactions take place, being a signalling parameter about nutrient bioavailability and the presence of potential limiting factors (salinity, polyphenols, etc.); also, it is associated to the capacity of the process to reduce the pathogen contents [8]. At the beginning of the process, the temperature increased very slowly in all the mixtures except for pile B (Fig 1), probably as a consequence of its higher contents in water-soluble easy-degradable compounds (Table 2), due to the use of GM, with greater amounts of these compounds than EGM [2]. The initial inhibition of the thermophilic phase during composting of winery and distillery wastes has been reported by other authors [7, 10, 29]. The presence of compounds with antimicrobial effect, such as polyphenols, and the acidic character of this type of wastes could be responsible for this temperature profile [10, 29, 30]. The use of the manures as co-composting ingredients, in general, induced better conditions in the initial composting mixtures, reducing some of the limiting factors linked to winery-distillery wastes, such as the acidic character, since the pH of the initial mixtures (pH = 7.9 for pile A; pH = 7.1 for piles B and C) (S1 Table) was in the range 6–8, suggested as suitable for composting [8]. However, in pile C, the use of PM seemed not to have the same positive effect, showing this pile the lowest thermophilic temperature values at the beginning of the process. This initial inhibition could be due to the higher concentrations of polyphenolic compounds of this waste (Table 1), which induced the highest contents of these compounds in the initial mixture of pile C (2568 mg/kg for pile C compared to 1125 mg/



**Fig 1. Temperature profiles of the composting piles.** Pile A [76% exhausted grape marc + 24% cattle manure]; pile B [72% grape marc + 28% cattle manure]; and pile C [67% exhausted grape marc + 33% poultry manure].

doi:10.1371/journal.pone.0138925.g001

kg for pile A and 1446 mg/kg for pile B) (S1 Table). The turnings carried out throughout composting, especially the second one, reactivated the process in all the mixtures by the increase in the microbial activity, producing the maximum temperature rise in all the composting mixtures. This reactivation of the composting process with turnings was also reported by Bustamante et al. [29] during an experiment of composting of anaerobic digestate using different

**Table 2. Evolution during composting of organic matter-linked parameters usually considered in the classical analytical approach (dry matter basis).**

| Composting phase <sup>a</sup>                                | TOC/TN     | WSC (%)     | WSC/TN      | Cfa (%)     | Cha (%)     | HR (%)       | HI (%)      | Pha (%)      | Cha/Cfa     |
|--|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| <i>Pile A: 76% exhausted grape marc + 24% cattle manure</i>  |            |             |             |             |             |              |             |              |             |
| I (0)  | 21.9 ± 0.4 | 3.14 ± 0.01 | 1.42 ± 0.04 | 3.54 ± 0.16 | 2.98 ± 0.09 | 12.99 ± 0.23 | 5.94 ± 0.14 | 45.72 ± 1.89 | 0.84 ± 0.06 |
| T (28)   | 18.4 ± 1.4 | 2.80 ± 0.03 | 1.10 ± 0.06 | 3.14 ± 0.07 | 3.02 ± 0.04 | 12.89 ± 0.44 | 6.32 ± 0.19 | 49.01 ± 0.20 | 0.96 ± 0.01 |
| E (105)  | 17.9 ± 0.8 | 2.70 ± 0.01 | 1.05 ± 0.05 | 2.77 ± 0.05 | 1.60 ± 0.05 | 9.33 ± 0.02  | 3.41 ± 0.12 | 36.58 ± 1.18 | 0.58 ± 0.03 |
| M (168)  | 17.4 ± 0.4 | 1.10 ± 0.03 | 0.42 ± 0.02 | 1.24 ± 0.01 | 1.16 ± 0.03 | 5.23 ± 0.01  | 2.52 ± 0.04 | 48.15 ± 0.86 | 0.93 ± 0.03 |
| <i>Pile B: 72% grape marc + 28% cattle manure</i>            |            |             |             |             |             |              |             |              |             |
| I (0)  | 21.1 ± 0.0 | 4.27 ± 0.00 | 1.82 ± 0.01 | 3.86 ± 0.05 | 4.59 ± 0.11 | 17.24 ± 0.42 | 9.20 ± 0.27 | 54.46 ± 0.23 | 1.20 ± 0.01 |
| T (28)   | 19.2 ± 0.8 | 3.72 ± 0.09 | 1.54 ± 0.11 | 4.08 ± 0.07 | 4.61 ± 0.01 | 18.04 ± 0.02 | 9.57 ± 0.08 | 53.06 ± 0.48 | 1.13 ± 0.02 |
| E (105)  | 17.6 ± 0.5 | 3.51 ± 0.00 | 1.35 ± 0.03 | 3.13 ± 0.06 | 4.00 ± 0.08 | 15.43 ± 0.43 | 8.65 ± 0.24 | 56.06 ± 0.01 | 1.28 ± 0.00 |
| M (168)  | 17.1 ± 0.0 | 1.86 ± 0.12 | 0.69 ± 0.05 | 2.91 ± 0.01 | 1.43 ± 0.10 | 9.44 ± 0.26  | 3.11 ± 0.23 | 32.97 ± 1.50 | 0.49 ± 0.03 |
| <i>Pile C: 67% exhausted grape marc + 33% poultry manure</i> |            |             |             |             |             |              |             |              |             |
| I (0)  | 14.8 ± 0.3 | 3.29 ± 0.04 | 1.15 ± 0.01 | 3.53 ± 0.04 | 2.69 ± 0.25 | 17.24 ± 0.69 | 5.96 ± 0.57 | 54.46 ± 2.01 | 1.20 ± 0.06 |
| T (28)   | 12.7 ± 0.2 | 2.84 ± 0.02 | 1.05 ± 0.02 | 2.95 ± 0.01 | 3.35 ± 0.06 | 13.87 ± 0.12 | 7.37 ± 0.14 | 53.14 ± 0.54 | 1.13 ± 0.02 |
| E (105)  | 13.9 ± 0.3 | 2.68 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 | 3.05 ± 0.10 | 1.84 ± 0.05 | 11.09 ± 0.20 | 4.18 ± 0.08 | 37.66 ± 1.38 | 0.60 ± 0.07 |
| M (168)  | 13.5 ± 0.1 | 0.98 ± 0.01 | 0.31 ± 0.00 | 1.43 ± 0.06 | 0.81 ± 0.01 | 5.34 ± 0.17  | 1.93 ± 0.02 | 36.20 ± 0.71 | 0.57 ± 0.02 |

TOC: total organic C; TN: total organic N; WSC: water-soluble C; Cfa: fulvic acid-like C; Cha: humic acid-like C; HR: humification ratio; HI: humification index; Pha: percentage of humic acid-like C; Cha/Cfa: ratio of humic acid-like C/fulvic acid-like C.

<sup>a</sup> Days in brackets.

I: initial phase of composting; T: thermophilic phase of composting; E: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase. Values reported as mean ± standard error (n = 3).

doi:10.1371/journal.pone.0138925.t002

bulking agents. According to the EXothermic Index, EXI (calculated as the summation of the daily value obtained by subtracting the ambient temperature from the temperature value in the composting pile during the bio-oxidative phase of composting, and expressed as cumulated°C), pile B had the most exothermic behavior (1741 cumulated°C), while piles A and C were quite similar (1344 and 1317, respectively), probably due to the previously commented different content in labile compounds in GM and EGM, the last one obtained after grape marc-washing processes carried out in the distillery.

### Organic matter evolution during composting: classical analytical approach

The organic matter degradation profile during composting, as determined by OM losses (data not shown), followed a first-order kinetic equation in the composting piles, OM losses (%) =  $A(1 - e^{-kt})$ . Curve fitting of the experimental data gave the following parameter values (standard deviation in brackets):

Pile A :  $A = 49.6$  (8.1),  $k = 0.0131$  (0.0040), RMS = 0.878,  $F = 65.8^{***}$ , SEE = 4.89

Pile B :  $A = 44.2$  (6.7),  $k = 0.0215$  (0.0072), RMS = 0.769,  $F = 31.0^{***}$ , SEE = 6.45

Pile C :  $A = 50.4$  (9.1),  $k = 0.0091$  (0.0030), RMS = 0.880,  $F = 95.8^{***}$ , SEE = 5.99,

where RMS is the residual mean square. All equations were significant at  $P < 0.001$ . The OM degradation kinetics of all the piles fitted satisfactorily this equation. The  $A$  and  $k$  values obtained were lower than those reported by different authors in other composting experiments using livestock and agroindustrial wastes [8, 31, 32], probably due to the composting scale used, with a pile weight much lower than those of the commented experiments. The maximum degradation of OM ( $A$ ) was observed in pile C, but the greatest OM degradation rate was observed in pile B (in accordance with the highest previously commented EXI), since this pile showed the highest values of  $k$  and the product of  $A \times k$ , showing the highest degradation rate the mixture with GM compared to those with EGM.

All the piles showed a decrease in the TOC/TN ratio values (Table 2), especially at the beginning of the composting process and in piles A and B, corresponding to the highest OM degradation rates observed in these piles, showing pile C the lowest decrease in the TOC/TN ratio. At the end of the composting process, the TOC/TN ratio reached values  $< 20$  in all piles, suggesting that all composts had reached an acceptable degree of maturation [4]. However, in pile C, the initial TOC/TN ratio value was lower than the reference value for mature compost and therefore, this maturity parameter cannot be used as the only maturity indicator for this pile. Thus, this fact evidences the previously commented need of using different parameters to estimate compost maturity.

The water-soluble organic C represents the most active fraction of carbon and is indicative of compost stability, since it is constituted by sugars, hemicellulose, phenolic substances, amino acids, peptides and other easily biodegradable substances [33]. Therefore, the study of the transformations occurring in the soluble OM can be useful for assessing compost maturity. In this sense, the evolution of the water-soluble organic C and of the water-soluble organic C to the total organic N ratio (WSC/TN) can be considered as suitable parameters for assessing compost maturity [4]. The contents of water-soluble C decreased in all the piles throughout the composting process (Table 2), due to the degradation of simple, water-soluble organic compounds [8]. At the end of the process, in general, all the piles had values lower or close to 1.7%, the maximum value suggested for a compost to be considered mature [4]. The WSC/TN also

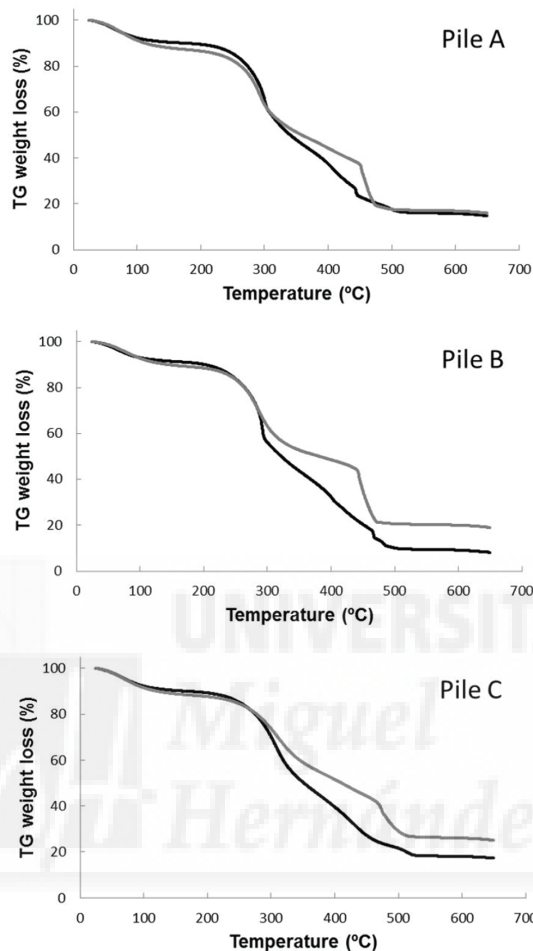
decreased in all the piles throughout the composting process (Table 2), with decreases in relation to the initial value of 70%, 62% and 73% for the piles A, B and C, respectively, due to the degradation of simple water-soluble organic compounds, such as sugars, amino acids, and peptides [33]. The final values of this ratio ranged between 0.31 and 0.69, within the limit value established for a mature compost [4].

Regarding the humification parameters, such as the humification indexes (HI, HR, Pha, Cha/Cfa) and/or the contents in humic and fulvic acid-like C (Cha and Cfa), their increases during composting have been reported in different studies as indicative of OM humification [4]. However, in this experiment, these parameters have not shown the classical trend of increasing throughout the composting process, showing, in general, all the piles a decrease from the initial values (Table 2), this fact being also observed by other authors [8, 34]. This could be attributed to the alkaline co-extraction and partial acid co-precipitation of incompletely or not humified components of organic matter, such as the polyphenols present in the winery and distillery wastes, which hid the real evolution of the humic fraction. This fact was reported by Marhuenda-Egea et al. [18] that confirmed this interference using fluorescence excitation–emission matrix to determine humic–fulvic evolution during composting of winery and distillery residues. Moreover, this shows the high dependence of these parameters on the origin of the raw materials used, being not useful to evaluate the humification in all types of compost, highlighting the need of using other analytical and/or instrumental techniques to evaluate compost maturity.

### Organic matter evolution during composting: advanced instrumental approach

**Thermal tools.** Thermogravimetric analysis (TG, DTG and DTA) were carried out to assess the changes in organic matter during the composting process. The thermograms of the compost samples for the piles A, B and C, corresponding to the initial and maturity stage of composting are shown in Fig 2. These thermograms displayed different steps-regions in the thermal analysis, linked to the complexity of the organic matter present in the compost samples. In the presence of atmospheric oxygen, two exothermic phenomena may occur in compost characterization, such as volatilization of aliphatic compounds or carbohydrates and the oxidation of high molecular weight compounds [35]. A clear change within the range of 250°C to 550°C is shown, which corresponds to the combustion of carbohydrates, aromatic compounds and other substances [35]. The three piles showed a similar behavior, the amount of matter that was burned being higher in the initial sample than in the corresponding mature compost sample at the same temperature. This trend suggests a progressive transformation of the biomass in the polyelectrolyte macromolecules known as humified matter and thus, the increase in the molecular weight, stability, and aromatization degree during the co-composting process [19, 36]. The heat-labile material was decomposed in the early stages of composting, producing that with time the most recalcitrant material become the material predominant in the compost piles. In the DTG profiles, three peaks can be distinguished between 250 and 530°C (Fig 3), associated to the degradation of organic matter [35]. The first peaks were obtained in the range between 250 and 400°C and the third one appeared between 450 and 500°C. The two peaks within the range of 250–420°C could be attributed to the combustion of carbohydrates, such as cellulose and lignocellulosic [35], which are main components of the plant material present in the winery and distillery wastes. The first peak decreased considerably with time in the piles B and C; however, in the samples of pile A only a slight change was observed (Fig 3). This fact could be due to a higher availability of easily degradable compounds, such as carbohydrates and proteins, in these piles. This confirms the previous results





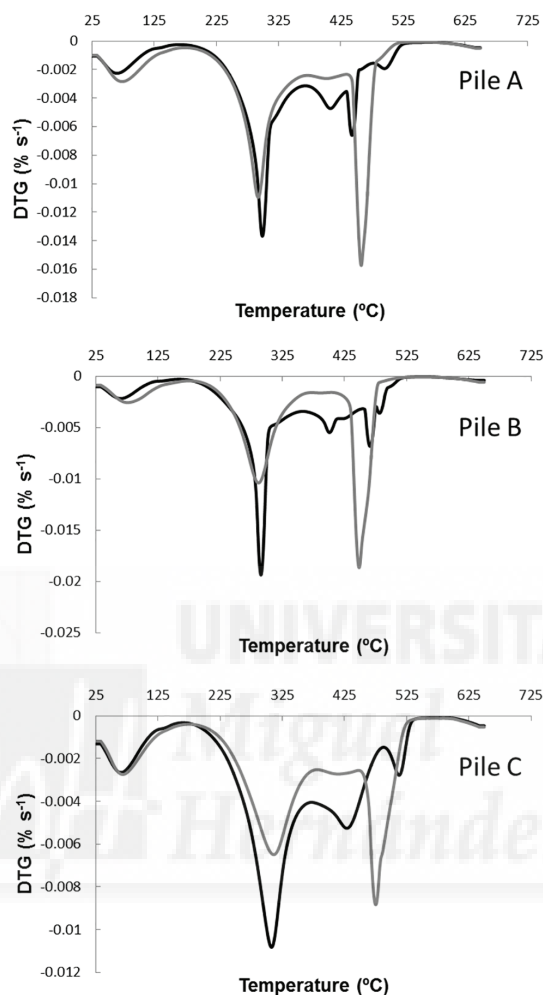
**Fig 2. TG curves for the compost samples of piles A, B and C.** Black line corresponds to the samples at the initial phase of the composting process and the grey line corresponds to the mature composts.

doi:10.1371/journal.pone.0138925.g002

concerning the higher degradation rate observed in these piles, especially in pile B, using the classical analytical approach. Moreover, the contents in carbohydrates in the piles decreased throughout the composting process due to the microbial degradation processes, implying an enrichment in recalcitrant material due to the concentration effect. These recalcitrant compounds constitute the fraction of material that combusted in the range of 450 and 500°C. Different authors [35, 37] have also attributed the range between 350–500°C to the degradation of complex aromatic structures, such as the humified organic matter. Therefore, more stabilized samples take more energy for decomposition, e.g. require higher temperatures to achieve the same mass losses, due to these samples are richer in highly complex aromatic compounds compared to the initial ones, which indicates the OM stabilization during the composting process.

The DTA profiles of the organic matter displayed two distinct exothermic peaks (between 250–400°C and between 400–580°C) (Fig 4), which indicated the thermal reactions of organic

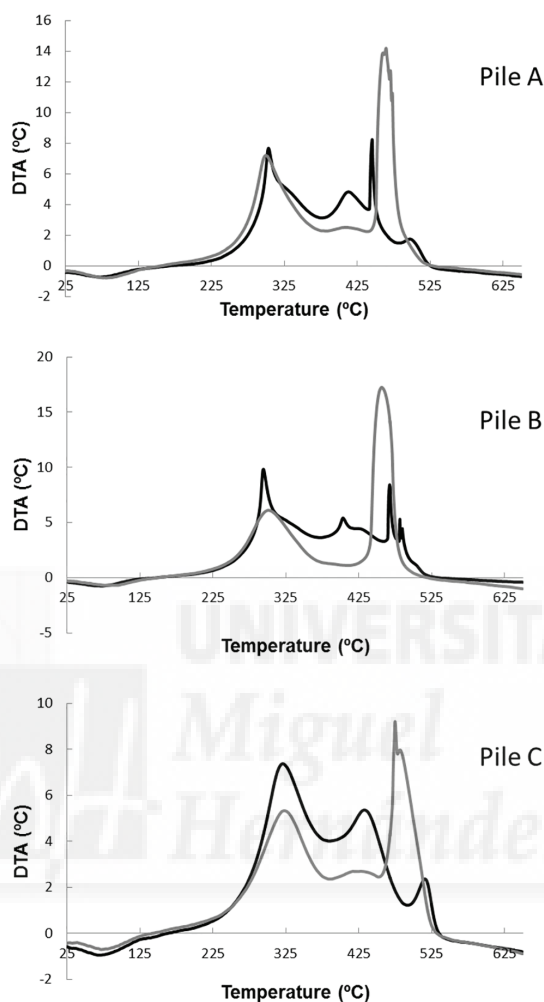




**Fig 3. DTG curves for the compost samples of piles A, B and C.** Black line corresponds to the samples at the initial phase of the composting process and the grey line corresponds to the mature composts.

doi:10.1371/journal.pone.0138925.g003

components characterized by different thermal stability [19, 37]. A decrease in the relative intensity of the first exothermic peak was observed in DTA profiles. This fact indicates the progressive degradation of the carbohydrates and aliphatic compounds [19, 38] and of some easily biodegradable aromatic structures [39]. At the same time, an increase in the second peak intensity was observed in sequential samplings of the composting piles. This peak is associated to more complex aromatic structures with high molecular weights, such as lignin [39, 40]. The increase in the intensity of this peak can be related to the release of the aromatic structures after deterioration of the lignocellulose complex and thus, the condensation of these structures [40]. Therefore, this peak can be attributed to the increase in the aromatic fraction in the mature samples. These exothermic reactions were associated with the peaks in the TG and DTG curves, linked with loss weight, but not with energy. The indexes R1 and R2 can



**Fig 4.** DTA curves for the compost samples of piles A, B and C. Black line corresponds to the samples at the initial phase of the composting process and the grey line corresponds to the mature composts.

doi:10.1371/journal.pone.0138925.g004

summarize the observed organic matter transformations [41]. R1 is the ratio between the mass loss associated with the two main exothermic reactions at TG (Table 3), and R2 is the ratio of the peak areas in the DTA analysis. In all the piles, the R1 ratio increased during composting, thus revealing a high sensitivity of this parameter to the chemical changes induced by the bio-transformation of organic materials. This shows the relative amount of the most thermally-stable fraction of the organic matter with respect to the less stable one. R2 behavior was similar to the R1, but the difference associated between the initial and mature samples was higher than in R1. R2 evolution showed that the most labile organic matter (i.e., cellulose), which requires less energy for its combustion, disappeared during the first stages of the composting process, remaining an organic matter more complex and therefore, with higher thermal stability (Table 3).

**Table 3. R1 and R2 indexes from TG and DTA analysis of the compost samples at the initial (I) and maturity (M) phases of composting.**

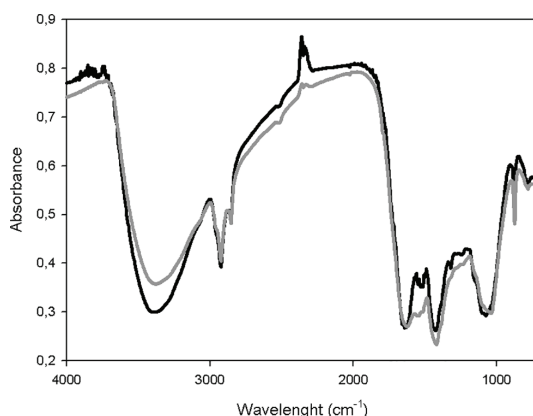
|  | TG (% mass losses) |             |            | DTA (peak area) |             |            |
|--|--------------------|-------------|------------|-----------------|-------------|------------|
|  | Peak 1 (P1)        | Peak 2 (P2) | R1 (P2/P1) | Peak 1 (P1)     | Peak 2 (P2) | R2 (P2/P1) |
| <i>Pile A: 76% exhausted grape marc + 24% cattle manure</i>  |                    |             |            |                 |             |            |
| I  | 51.9               | 19.8        | 0.38       | 572             | 76          | 0.13       |
| M  | 42.2               | 26.7        | 0.63       | 576             | 902         | 1.57       |
| <i>Pile B: 72% grape marc + 28% cattle manure</i>            |                    |             |            |                 |             |            |
| I  | 57.6               | 22.3        | 0.39       | 752             | 137         | 0.18       |
| M  | 39.9               | 27.8        | 0.70       | 891             | 1425        | 1.60       |
| <i>Pile C: 67% exhausted grape marc + 33% poultry manure</i> |                    |             |            |                 |             |            |
| I  | 49.6               | 18.0        | 0.36       | 804             | 114         | 0.14       |
| M  | 36.0               | 22.5        | 0.62       | 699             | 696         | 1.00       |

doi:10.1371/journal.pone.0138925.t003

These results suggested an enhancement of the number of stable compounds through two ways, either by a concentration effect due to the loss of the most labile material during composting and/or by the novo synthesis of more stable and complex compounds, such as the humic-like substances. Presumably, both processes occur simultaneously due to the microbial activity during the composting process.

**Spectroscopic tools: FT-IR and CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR techniques**

FT-IR spectra from the most representative samples (initial and mature samples of pile C) are displayed in Fig 5. Some of the most significant peaks are pointed. The variations in the FT-IR spectra during composting time were minor. The region between 2930–2880 cm<sup>-1</sup> could be attributed to aliphatic groups in fatty acids [22] and its stationary behavior during the composting indicated the presence of vegetable material highly resistant to microbiological degradation, probably associated to molecules of vegetable origin like cutines, suberines or lignins [18]. Variations between piles and time of sampling in the FT-IR spectra were appreciated between 1800 and 600 cm<sup>-1</sup> region. The band around 1540 cm<sup>-1</sup> can be assigned to amide II and components containing lignin. These bands were identified in biowastes due to their content of wood and plants, which are rich in lignin [20]. The peak at 1420 cm<sup>-1</sup> was due to the



**Fig 5. FTIR spectra of the samples of pile C during the composting process. Initial stage (black line) and maturity stage (grey line).**

doi:10.1371/journal.pone.0138925.g005

**Table 4. Relative absorbance in % of the sum of all the peak heights of the FT-IR spectra of the composting samples.**

| Composting phase <sup>a</sup>                                | Relative absorbance (%) |                      |                       |                       |                       |                       |                       |                      |                 |
|--|-------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
|  | 2927 cm <sup>-1</sup>   | 2854 m <sup>-1</sup> | 1640 cm <sup>-1</sup> | 1548 cm <sup>-1</sup> | 1420 cm <sup>-1</sup> | 1384 cm <sup>-1</sup> | 1037 cm <sup>-1</sup> | 875 cm <sup>-1</sup> | 1037/1384 ratio |
| <i>Pile A: 76% exhausted grape marc + 24% cattle manure</i>  |                         |                      |                       |                       |                       |                       |                       |                      |                 |
| I (0)  | 10.4                    | 12.9                 | 9.9                   | 12.6                  | 10.7                  | 12.5                  | 11.4                  | 19.6                 | 0.91            |
| T (28)   | 12.7                    | 15.5                 | 8.8                   | 11.3                  | 11.5                  | 12.0                  | 9.8                   | 18.5                 | 0.81            |
| E (105)  | 13.2                    | 16.3                 | 8.5                   | 10.5                  | 11.0                  | 11.4                  | 10.2                  | 19.0                 | 0.89            |
| M (168)  | 13.8                    | 16.3                 | 8.9                   | 10.2                  | 10.8                  | 11.3                  | 10.4                  | 18.2                 | 0.92            |
| <i>Pile B: 72% grape marc + 28% cattle manure</i>            |                         |                      |                       |                       |                       |                       |                       |                      |                 |
| I (0)  | 11.8                    | 14.7                 | 9.3                   | 12.0                  | 11.9                  | 12.2                  | 10.0                  | 18.2                 | 0.82            |
| T (28)   | 12.4                    | 15.2                 | 9.2                   | 11.5                  | 11.6                  | 12.0                  | 10.3                  | 17.9                 | 0.86            |
| E (105)  | 12.4                    | 14.7                 | 10.1                  | 11.5                  | 11.8                  | 11.9                  | 10.7                  | 17.1                 | 0.89            |
| M (168)  | 11.9                    | 15.2                 | 9.5                   | 10.2                  | 10.7                  | 11.8                  | 11.3                  | 19.3                 | 0.96            |
| <i>Pile C: 67% exhausted grape marc + 33% poultry manure</i> |                         |                      |                       |                       |                       |                       |                       |                      |                 |
| I (0)  | 13.6                    | 16.7                 | 9.2                   | 12.3                  | 9.1                   | 10.9                  | 10.8                  | 17.5                 | 0.99            |
| T (28)   | 13.4                    | 15.7                 | 10.1                  | 12.3                  | 9.9                   | 11.1                  | 11.3                  | 16.2                 | 1.02            |
| E (105)  | 13.6                    | 15.9                 | 10.5                  | 12.1                  | 9.5                   | 10.6                  | 11.2                  | 16.6                 | 1.06            |
| M (168)  | 14.9                    | 17.6                 | 10.0                  | 10.6                  | 8.5                   | 10.0                  | 10.8                  | 17.5                 | 1.08            |

<sup>a</sup> Days in brackets.

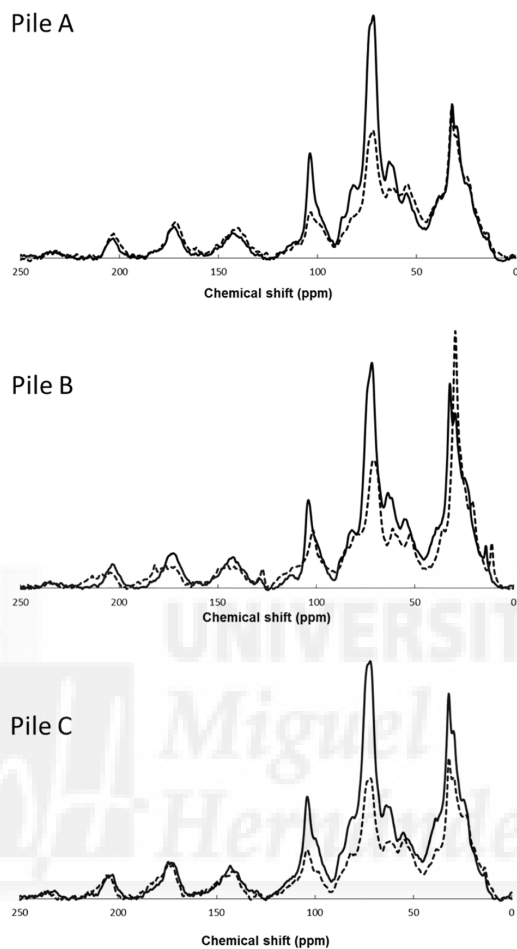
I: initial phase of composting; T: thermophilic phase of composting; E: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase.

doi:10.1371/journal.pone.0138925.t004

OH in-plane bend of carboxylic acids, the CO<sub>2</sub> stretch of carboxylates and the aliphatic CH<sub>2</sub> group of alkanes. The band at 1384 cm<sup>-1</sup> was assigned to nitrate and inorganic components as carbonates absorb at 875 cm<sup>-1</sup>. However, a visual inspection of the FT-IR spectra bands of the samples did not show valuable differences among the samples during the composting process. In order to detect possible variations of the FT-IR bands during composting, the relative absorbance (rA) of certain signals was used [11, 20]. The relative absorbance is the height of one distinct band multiplied by 100 and divided by the sum of all compared band heights [42]. Bands heights were measured and corrected referring to the chosen baseline by OMNIC 5.1b software. Eight bands were used to calculate relative absorbances (rA): 2927, 2854, 1640, 1548, 1428, 1384, 1037, and 875 cm<sup>-1</sup> (Table 4).

In this experiment, only the rA ratio between 1037 and 1384 cm<sup>-1</sup> signal showed changes with time and type of pile, associated to the infrared (IR) spectra bands assigned to the C/N ratio (1037 and 1384 cm<sup>-1</sup>). Piles B and C showed increases of 17 and 9% in this ratio during the composting that were negatively correlated to the observed increase of the TOC/TN ratio using the classical analytical approach, which could be used as indicator of compost stability. In addition, there was an increase in the values of rA of signals attributed to C aliphatic (2927 cm<sup>-1</sup> band); however, the latest aspect was only clear for pile C. These results could be explained by the fact that these signals are generated by molecules of vegetable origin, very resistant to degradation, which could induce a concentration effect, since other labile compounds are degraded during the composting process.

The CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR spectra show several principal peaks corresponding to the samples collected at the beginning of the composting process at 204, 175, 142, 130, 105, 72, 62, 55, 33, 30 and 24 ppm (Fig 6). An increase of alkyl C in the 0–50 ppm region, associated to the degradation of aliphatic components was measured for the sample of pile B. This result could be due to the breakdown of polysaccharides, presumably in higher amount in pile B due to the use of GM as component, yielding simple alkyl chains [21, 23]. A shoulder appears around 25 ppm in



**Fig 6. CPMAS  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the samples of piles A, B and C during composting.** Beginning (solid line) and end (dotted line).

doi:10.1371/journal.pone.0138925.g006

CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra, indicating the presence of methyl groups in alkyl chains. The methyl group presents an elevated mobility and, therefore, a weak coupling [11]. At 30 and 33 ppm, appear the methyl and methylene groups, respectively. The main difference between methyl and methylene groups is related to carbon dipolar interactions with linked protons. The peak that appears around 55 ppm in CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra supports the assignment to  $\text{C}\alpha$  of polypeptides [43]. However, the signal at 55 ppm in CP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra can be also assigned to O-CH<sub>3</sub> groups in lignin (phenolmethoxyl of coniferyl and sinapyl moieties) and in hemicellulose (glucuronic acid in xylan) [19]. These composts principally derived from plant and organic remains, and thus, contain different biomolecules, such as proteins and peptides, as well as lignin and hemicellulose. So, the signal around 55 ppm has contribution from  $\text{C}\alpha$  of polypeptides and O-CH<sub>3</sub> groups in lignin and in hemicellulose [44]. Also, the spectra were dominated by a strong signal around 72 ppm, assigned to cellulose and hemicellulose in

**Table 5. Relative intensity (%) of each C type by integration of the solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of the compost samples.** The chemical shift regions were: A) alkyl (45 to -10 ppm); B) N-alkyl/methoxy (60–45 ppm); C) O-alkyl (95–60 ppm); D) O2-alkyl (110–95 ppm); E) aromatic (145–110 ppm); F) O-aromatic (165–145 ppm); G) carbonyl (210–165 ppm).

| Composting phase <sup>a</sup>                                | Chemical shift regions |      |      |      |     |     |      | Alkyl/O-Alkyl ratio |
|--|------------------------|------|------|------|-----|-----|------|---------------------|
|  | A                      | B    | C    | D    | E   | F   | G    |                     |
| <i>Pile A: 76% exhausted grape marc + 24% cattle manure</i>  |                        |      |      |      |     |     |      |                     |
| I (0)  | 30.7                   | 17.0 | 31.7 | 7.8  | 3.3 | 3.5 | 6.1  | 0.97                |
| T (28)   | 36.4                   | 15.9 | 23.2 | 8.0  | 5.7 | 3.7 | 7.3  | 1.60                |
| E (105)  | 37.9                   | 16.1 | 21.2 | 7.7  | 6.3 | 3.9 | 6.9  | 1.79                |
| M (168)  | 37.3                   | 14.3 | 15.5 | 6.9  | 7.1 | 4.8 | 14.2 | 2.40                |
| <i>Pile B: 72% grape marc + 28% cattle manure</i>            |                        |      |      |      |     |     |      |                     |
| I (0)  | 33.6                   | 15.3 | 28.6 | 8.5  | 2.9 | 3.7 | 7.4  | 1.18                |
| T (28)   | 34.3                   | 13.7 | 28.1 | 9.2  | 3.6 | 3.6 | 7.5  | 1.22                |
| E (105)  | 33.3                   | 14.8 | 29.1 | 9.5  | 3.8 | 3.0 | 6.6  | 1.14                |
| M (168)  | 34.9                   | 15.2 | 25.9 | 8.5  | 3.3 | 4.0 | 8.2  | 1.35                |
| <i>Pile C: 67% exhausted grape marc + 33% poultry manure</i> |                        |      |      |      |     |     |      |                     |
| I (0)  | 30.8                   | 14.2 | 30.5 | 10.5 | 3.5 | 3.5 | 7.0  | 1.01                |
| T (28)   | 34.4                   | 14.6 | 26.9 | 8.5  | 3.2 | 4.0 | 8.5  | 1.28                |
| E (105)  | 33.9                   | 15.5 | 26.8 | 8.9  | 3.7 | 3.9 | 7.5  | 1.27                |
| M (168)  | 34.3                   | 15.5 | 23.6 | 7.9  | 3.4 | 5.0 | 10.2 | 1.45                |

<sup>a</sup> Days in brackets.

I: initial phase of composting; T: thermophilic phase of composting; E: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase.

doi:10.1371/journal.pone.0138925.t005

CP-MAS spectra. The chemical shift at 105 ppm has been assigned to different carbons of lignin-type moieties in CP-MAS spectra: The C2 carbons of both guaiacyl and syringyl lignin structures and the C6 carbon of syringyl units. This peak could be also attributed to quaternary aromatic carbons in tannins [11]. However, the low signal to noise (S/N) ratio in these spectra made difficult the assignment. In the CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR spectra, the region between 110 ppm and 170 ppm can be divided in two sub-regions: the first one, between 110–140 ppm is assigned to non-substituted aromatic C and C-substituted aromatic carbons [45]. The second region, between 140–160 ppm is attributed to aromatic carbons linked to O or N. The first region only shows peaks at 112 and 130 ppm. The second sub-region, between 140–160 ppm, exhibits peaks usually attributed to lignin or tannins [11]. The peak centered at 142 ppm is attributed to methoxy-substituted or hydroxy-substituted phenyl C [11]. The peak at 153 ppm is assigned to oxygen-substituted aromatic C, including both C-OCH3 and C-OH groups [46]. Also, the region between 170–210 ppm is assigned to carbonyl/carboxyl carbons of ester and amide groups [46]. The contribution of amides at the signals in this region should be important, because the nitrogen content is high (Table 5).

The area under the curves in the CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR spectra was calculated for the different regions (the regions are detailed in Materials and Methods section) (Table 5). The main C types are O-alkyl (95–60 ppm) and alkyl (45 to -10 ppm). These two regions experimented opposite evolutions with time. The O-alkyl (from cellulose and hemicellulose) signals decreases with the composting time, especially in piles A and C (Fig 6 and Table 5). Moreover, in all the piles, the intensity of the alkyl signals (from aliphatic chains, such as lipids, cutin or suberin) increases in the mature composts. Aliphatic structures of cutin and suberin molecules are resistant to biodegradation and thus, these molecules could have been accumulated throughout the composting process [36]. This shows a concentration effect over the C-alkyl by a preferential

**Table 6. Main properties of the mature composts obtained (dry matter basis).**

| Parameter                    | Compost A   | Compost B   | Compost C   |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| pH                           | 7.37 ± 0.01 | 7.98 ± 0.01 | 7.62 ± 0.02 |
| EC (dS m <sup>-1</sup> )     | 2.19 ± 0.05 | 2.88 ± 0.02 | 1.57 ± 0.02 |
| OM (%)                       | 80.7 ± 0.9  | 83.6 ± 0.3  | 76.7 ± 0.3  |
| TN (g kg <sup>-1</sup> )     | 2.64 ± 0.04 | 2.69 ± 0.01 | 3.22 ± 0.01 |
| P (g kg <sup>-1</sup> )      | 5.5 ± 0.2   | 4.7 ± 0.1   | 9.0 ± 0.4   |
| Na (g kg <sup>-1</sup> )     | 6.1 ± 0.0   | 4.7 ± 0.2   | 1.8 ± 0.1   |
| K (g kg <sup>-1</sup> )      | 18.9 ± 0.6  | 27.8 ± 0.1  | 18.8 ± 0.3  |
| Ca (g kg <sup>-1</sup> )     | 39.7 ± 0.4  | 33.5 ± 2.1  | 66.0 ± 2.8  |
| Mg (g kg <sup>-1</sup> )     | 4.6 ± 0.5   | 4.7 ± 0.3   | 4.3 ± 0.3   |
| Fe (mg kg <sup>-1</sup> )    | 1214 ± 46   | 1364 ± 111  | 984 ± 53    |
| Mn (mg kg <sup>-1</sup> )    | 120 ± 1     | 101 ± 9     | 173 ± 2     |
| Cu (mg kg <sup>-1</sup> )    | 32.8 ± 0.3  | 34.4 ± 0.1  | 58.5 ± 0.6  |
| Zn (mg kg <sup>-1</sup> )    | 160 ± 4     | 132 ± 2     | 165 ± 5     |
| WSPOL (mg kg <sup>-1</sup> ) | 552 ± 2     | 982 ± 8     | 432 ± 29    |
| GI (%)                       | 78.2 ± 1.9  | 68.4 ± 1.4  | 61.8 ± 0.3  |

EC: electrical conductivity; OM: organic matter; TN: total organic nitrogen; WSPOL: water-soluble polyphenols; GI: germination index. Values reported as mean ± standard error (n = 3).

doi:10.1371/journal.pone.0138925.t006

degradation of sugar polymer, as cellulose and hemicellulose, during the composting process (Fig 6) [36]. This preferential degradation pathway of cellulose and hemicellulose observed in the CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR data agreed with the previous thermal analysis data. Minor components in the CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR spectra of the compost samples were carbonyl (210–165 ppm), O-aromatic (165–145 ppm), aromatic (145–110 ppm), O2-alkyl (110–95 ppm), and N-alkyl/methoxy (60–45 ppm) [37]. The scatter of the data (Fig 6) could reflect the non-quantitative characteristic of the CP-MAS <sup>13</sup>C-NMR technique, as the errors show (the observable carbon contents for this type of compost samples were generally around 60–66%).

### Quality of the composts obtained

The main physico-chemical, chemical and biological properties of the final composts obtained are shown in Table 6. The composts obtained had final pH values close to neutrality and within the range (6.0–8.5) suggested as suitable for compost [47]. The EC values in all the composts were close to 2 dS/m, probably due to the presence of manure in the formulation of all the piles, showing the composts elaborated with CM (A and B), the greatest EC values. However, these values were similar or lower to those reported in composts with similar origin [7, 8, 10].

Organic matter (OM) concentrations were similar in all the composts and higher than the minimum values established by the Spanish and the European legislation (35% and 30%, respectively for OM) [48, 49]. TN contents were greater than 2% in all the composts, which were affected by the manure nature, showing the compost elaborated with PM (compost C) the highest TN concentrations. These contents were similar to those reported in composts elaborated using agroindustrial wastes and manures [8, 10, 12, 28, 29, 32]. The concentrations in other macronutrients, such as P and K, were higher or similar to those found in other materials usually considered as organic amendments, such as composts from agroindustrial wastes and manures [12] K contents in the compost B, elaborated using GM, were significantly higher than in the rest, due to the higher contents of water-soluble elements in this material [2], while P contents were similar in the composts A and B, elaborated using CM, and lower than in

compost C, due to the use of PM. Contents of Ca ranged between 34–66 g/kg, showing compost C higher levels, and Na contents were significantly lower than those reported for manure-derived composts [29], this aspect being an additional added value of these composts. The micronutrient concentrations were similar or lower than those observed in composts from agroindustrial wastes and manures, previously mentioned, the values of Cu and Zn being lower than the limit values established for compost by the Spanish legislation and the European guidelines [48, 49].

Regarding other parameters related to the compost maturity and/or stability, the contents in water-soluble polyphenols, compounds that in high levels inhibit the germination [8], were quite lower than those observed in the raw materials. All the composts also showed absence of phytotoxicity, with values of the germination index > 50%, the minimum value established by Zucconi et al. [24].

## Conclusions

In conclusion, the classical analytical methods have shown a suitable development of the composting process in all the piles, with a more significant effect of the winery-distillery waste used than of the type of manure, but obtaining in all the scenarios end-products with suitable properties and a good degree of maturity for their agricultural use. However, the classical analytical approach has also been shown to be ineffective to study the humification process during composting of this type of materials. Therefore, thermal analysis techniques has been useful to elucidate the degradability of the remaining material and additionally, to assess qualitatively the rate of OM stabilization and recalcitrant C in the compost samples; FT-IR has allowed to identify functional groups in composting, which indicates composted material stability and maturity; while CPMAS <sup>13</sup>C-NMR has provided semi-quantitatively partition of C compounds and structures during the process, being especially interesting their variation to evaluate the biotransformation of each C pool, especially in the comparison of recalcitrant C vs labile C pools, e.g. Alkyl /O-Alkyl ratio. Therefore, the combination of instrumental techniques clearly complemented the existing classical analytical tools, especially those based on non-specific chemical determinations. Also, the knowledge of the structural and functional nature of mature compost will help to predict the behavior of compost in agronomic uses.

## Supporting Information

**S1 Fig. FTIR spectra of the samples of piles A and B.**  
(TIF)

**S1 Table. Evolution physico-chemical and other chemical parameters during composting.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

This paper has been written in the framework of the project associated to the reference PTQ-12-05655 of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+i) 2008–2011).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAB FCME RM MDPM CP APE. Performed the experiments: ATC PG JMM MAB FCME RM. Analyzed the data: ATC PG JMM MAB FCME RM MDPM CP APE. Contributed reagents/materials/analysis tools: ATC PG JMM MAB



FCME RM MDPM CP APE. Wrote the paper: ATC PG JMM MAB FCME RM MDPM CP APE.

## References

- OIV. The OIV's assessment of the world vitiviniculture situation. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Available: <http://www.oiv.int>.
- Bustamante MA, Moral R, Paredes C, Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J, Pérez-Murcia MD. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* 2008; 28: 372–380.
- Arvanitoyannis IS, Ladas D, Mavromatis A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology* 2006; 41: 475–487.
- Bernal MP, Albuquerque JA, Moral R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology* 2009; 100: 5444–5453. doi: [10.1016/j.biortech.2008.11.027](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027) PMID: [19119002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19119002/)
- Moldes AB, Vázquez M, Domínguez JM, Díaz-Fierros F, Barral MT. Evaluation of mesophilic biodegraded grape marc as soil fertilizer. *Appl Biochem Biotech.* 2007; 141: 27–36.
- Paradelo R, Moldes AB, Barral MT. Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. *J Environ Manage.* 2013; 116: 18–26. doi: [10.1016/j.jenvman.2012.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.12.001) PMID: [23274588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23274588/)
- Ranalli G, Bottura G, Taddei P, Garavani M, Marchetti R, Sorlini C. Composting of solid and sludge residues from agricultural and food industries. Bioindicators of monitoring and compost maturity. *J Environ Sci Health* 2001; A36, 4: 415–436.
- Bustamante MA, Paredes C, Marhuenda-Egea FC, Pérez-Espinosa A, Bernal MP, Moral R. Co-composting distillery wastes with animal manure: carbon and nitrogen transformations and evaluation of compost stability. *Chemosphere* 2008; 72: 551–557. doi: [10.1016/j.chemosphere.2008.03.030](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.030) PMID: [18466954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18466954/)
- Fernández FJ, Sánchez-Arias V, Villaseñor J, Rodríguez L. Evaluation of carbon degradation during co-composting of exhausted grape marc with different biowastes. *Chemosphere* 2008; 73: 670–677. doi: [10.1016/j.chemosphere.2008.07.007](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.007) PMID: [18715609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18715609/)
- Bustamante MA, Paredes C, Moral R, Moreno-Caselles J, Perez-Murcia MD, Perez-Espinosa A, et al. Co-composting of distillery and winery wastes with sewage sludge. *Water Sci Technol.* 2007; 56: 187–192. PMID: [17849994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17849994/)
- Martínez-Sabater E, Bustamante MA, Marhuenda-Egea FC, El-Khattabi M, Moral R, Lorenzo E, et al. Study of the evolution of organic matter during composting of winery and distillery residues by classical and chemometric analysis. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 9613–9623. doi: [10.1021/jf901027v](https://doi.org/10.1021/jf901027v) PMID: [19795879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795879/)
- Bustamante MA, Suárez-Estrella F, Torrecillas C, Paredes C, Moral R, Moreno J. Use of chemometrics in the chemical and microbiological characterization of composts from agroindustrial wastes. *Bioresource Technol.* 2010; 101: 4068–4074.
- Castaldi P, Alberti G, Merilla R, Melis P. Study of the organic matter evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Manage.* 2005; 25: 209–213.
- Baffi C, Dell'Abate MT, Nassisi A, Silva S, Benedetti A, Genevini PG, et al. Determination of biological stability in compost: A comparison of methodologies. *Soil Biol. Biochem.* 2007; 39: 1284–1293.
- Albrecht R, Verrecchia E, Pfeifer HR. The use of solid-phase fluorescence spectroscopy in the characterization of organic matter transformations. *Talanta* 2015; 134: 453–459. doi: [10.1016/j.talanta.2014.11.056](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.056) PMID: [25618693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25618693/)
- Dell'Abate MT, Benedetti A, Sequi PJ. Thermal methods of organic matter maturation monitoring during a composting process. *Therm Anal Cal.* 2000; 61: 389–396.
- Smidt E, Lechner P. Study on the degradation and stabilization of organic matter in waste by means of thermal analyses. *Thermochim Acta* 2005; 438/1-2: 22–28.
- Marhuenda-Egea FC, Martínez-Sabater E, Jordá J, Moral R, Bustamante MA, Paredes C, et al. Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: evaluation of the process by fluorescence excitation-emission matrix. *Chemosphere* 2007; 68: 301–309. PMID: [17292449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17292449/)
- Gómez X, Díaz MC, Cooper M, Blanco D, Morán A, Snape CE. Study of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric analysis and C-13 NMR. *Chemosphere* 2007; 68: 1889–1897. PMID: [17433408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17433408/)

20. Smidt E, Lechner P, Schwanninger M, Haberhauer G, Gerzabek MH. Characterization of waste organic matter by FT-IR spectroscopy: Application in waste science. *Appl Spectrosc*. 2002; 56: 1170–1175.
21. Chen YN. Nuclear magnetic resonance, infra-red and pyrolysis: application of spectroscopic methodologies to maturity determination of composts. *Compost Sci Util*. 2003; 11: 152–168.
22. Fialho LL, da Silva WTL, Milori DMBP, Simões ML, Martin-Neto L. Characterization of organic matter from composting of different residues by physicochemical and spectroscopic methods. *Biores Technol*. 2010; 101: 1927–1934.
23. Caricasole P, Provenzano MR, Hatcher PG, Senesi N. Evolution of organic matter during composting of different organic wastes assessed by CPMAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Waste Manage*. 2011; 31: 411–415.
24. Zucconi F, Pera A, Forte M, de Bertoldi M. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* 1981; 22: 54–57.
25. Wilson MA. *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*; Pergamon Press: Oxford, U.K., 1987.
26. Baldock JA, Smernik RJ. Chemical composition and bioavailability of thermally, altered *Pinus resinosa* (Red Pine) wood. *Org Geochem*. 2002; 33: 1093–1109.
27. Smernik RJ, Oades JM. The use of spin counting for determining quantitation in solid state <sup>13</sup>C NMR spectra of natural organic matter. 2. HF-treated soil fractions. *Geoderma* 2000; 96: 159–171.
28. Bernal MP, Navarro AF, Roig A, Cegarra J, García D. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biol Fert Soils* 1996; 22: 141–148.
29. Bustamante MA, Restrepo AP, Albuquerque JA, Perez-Murcia MD, Paredes C, Moral R, et al. Recycling of anaerobic digestates by composting: effect of the bulking agent used. *J Cleaner Prod*. 2013; 47: 61–69.
30. Friedman M. Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *J Agric Food Chem*. 2014; 62: 6025–6042. doi: [10.1021/jf501266s](https://doi.org/10.1021/jf501266s) PMID: [24945318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24945318/)
31. Paredes C, Roig A, Bernal MP, Sánchez-Monedero MA, Cegarra J. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol Fert Soils* 2000; 32(3): 222–227.
32. Bustamante MA, Albuquerque JA, Restrepo AP, de la Fuente C, Paredes C, Moral R, et al. Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials in agriculture. *Bio-mass Bioenerg*. 2012; 43: 26–35.
33. Said-Pullicino D, Erriquens FG, Gigliotti G. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresour Technol*. 2006; 98: 1822–1831. PMID: [16935491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16935491/)
34. Zbytynowski R, Buszewski B. Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1: chemical and spectroscopic properties. *Bioresour Technol*. 2005; 96: 471–478. PMID: [15491829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15491829/)
35. Ali M, Bhatia A, Kazmi AA, Ahmed N. Characterization of high rate composting of vegetable market waste using Fourier transform-infrared (FT-IR) and thermal studies in three different seasons. *Biodegradation* 2012; 23: 231–242. doi: [10.1007/s10532-011-9502-0](https://doi.org/10.1007/s10532-011-9502-0) PMID: [21814814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21814814/)
36. Almendros G, Dorado J, González-Vila FJ, Blanco MJ, Lankes U. <sup>13</sup>C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem*. 2000; 32: 793–804.
37. Smidt E, Eckhardt K, Lechner P, Schulten H, Leinweber P. Characterization of different decomposition stages of biowaste using FT-IR spectroscopy and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Biodegradation* 2005; 16: 67–79. PMID: [15727156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15727156/)
38. Fernandez JM, Plaza C, Polo A, Plante AF. Use of thermal analysis techniques (TG-DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste streams to predict biological stability prior to land application. *Waste Manage*. 2012; 32: 158–164.
39. El Ouaquodi FZ, El Fels L, Lemée L, Amblès A, Hafidi M. Evaluation of lignocellulose compost stability and maturity using spectroscopic (FTIR) and thermal (TGA/TDA) analysis. *Ecological Engineering* 2015; 75: 217–222.
40. El Ouaquodi FZ, El Fels L, Winterton P, Lemée L, Amblès A, Hafidi M. Study of humic acids during composting of lingo-cellulose waste by infrared spectroscopic and thermogravimetric/thermal differential analysis. *Compost Sci Util*. 2014; 22: 188–198.
41. Stevenson FJ. Extraction, fractionation and general chemical composition of soil organic matter. In: *Humus Chemistry*; Stevenson F. J., Ed.; Genesis, Composition, Reactions; Wiley: New York, 1982.

42. Haberhauer G, Rafferty B, Strebl F, Gerzabek MH. Comparison of the composition of forest soil litter derived from three different sites at various decompositional stages using FTIR spectroscopy. *Geoderma* 1998; 83: 331–342.
43. Mathers NJ, Xu Z, Blumfield TJ, Berners-Price SJ, Saffigna PG. Composition and quality of harvest residues and soil organic matter under windrow residue management in young hoop pine plantations as revealed by solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *For Ecol Manag.* 2003; 175: 467–488.
44. Nelson PN, Baldock JA. Estimating the molecular composition of a diverse range of natural organic materials from solid-state <sup>13</sup>C NMR and elemental analyses. *Biogeochemistry.* 2005; 72: 1–34.
45. Kögel-Knabner I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 2002; 34: 139–162.
46. Keeler C, Kelly EF, Maciel GE. Chemical–structural information from solid-state <sup>13</sup>C NMR studies of a suite of humic materials from a lower montane forest soil, Colorado, USA. *Geoderma.* 2006; 130: 124–140.
47. Hogg D, Favoino E, Centemero M, Caimi V, Amlinger F, Devliegher W, et al. Comparison of compost standards within the EU, North America and Australia, The Waste and Resources Programme (WRAP), Oxon, 2002.
48. BOE. Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. Boletín Oficial del Estado, no 164 (July 10, 2013), Sec. I. 51119–51207.
49. EC. European Commission. Working Document. Biological treatment of Biowaste. 2nd draft. Available: [http://europa.eu.int/comm/environment/waste/facts\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/environment/waste/facts_en.htm).





## Publicación 3.4

---

**SUSTAINABLE MANAGEMENT OF PIG SLURRY USING DIFFERENT COMPOSTING SCENARIOS:  
ASSESSMENT OF THE ORGANIC MATTER CHANGES**

J. Martín-Mata, C. Lahoz-Ramos, M.A. Bustamante, F.C. Marhuenda-Egea, R. Moral, A. Santos,  
J.A. Sáez, M.P. Bernal

*Science of the Total Environment* (en revisión).



the Total Environment

Elsevier Editorial System(tm) for Science of  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Sustainable management of pig slurry using different composting scenarios: assessment of the organic matter changes

Article Type: Research Paper

Keywords: pig slurry; organic matter; compost; <sup>13</sup>C-NMR; FT-IR; thermal analysis

Corresponding Author: Dr. M. A. Bustamante, PhD

Corresponding Author's Institution: University Miguel Hernandez

First Author: J. Martín-Mata

Order of Authors: J. Martín-Mata; C. Lahoz-Ramos; M. A. Bustamante, PhD; F.C. Marhuenda-Egea, PhD; R. Moral, PhD; A. Santos; J.A. Sáez; M.P. Bernal, PhD

Abstract: In this work, the association of different analytical techniques (thermal analysis, <sup>13</sup>C cross polarization magic angle spinning (CPMAS) NMR and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy) has been used to study the organic matter changes during the co-composting of pig slurry with cotton gin waste, developed in several scenarios, with different proportions of the raw materials and different type of composting system used. Also, the thermal stability index (R<sub>1</sub>) has been determined before and after a water-extraction method to eliminate water-soluble inorganic salts, to evaluate the effect of this procedure in the samples prior to thermal analysis. The results of the thermal methods showed the degradation of the most labile organic matter during composting; R<sub>1</sub> increased in all cases, without showing any influence on the presence of water-soluble inorganic ions in the sample. NMR showed during composting a decrease of the carbohydrate molecules and an increase of the aliphatic materials due to a concentration effect. Also, FT-IR spectroscopy was a useful technique to study the trend of polysaccharides and nitrates as compounds indicative of organic matter transformations during composting.

Suggested Reviewers: S. Houot PhD  
INRA Centre Versailles-Grignon  
Sabine.Houot@grignon.inra.fr

A. Sánchez PhD  
Universitat Autònoma de Barcelona  
antoni.sanchez@uab.cat

M. Lopez PhD  
UPC  
marga.lopez@upc.edu

E. Galli PhD  
IBAF-CNR, IBAF-CNR

emanuela.galli@ibaf.cnr.it

R. Paradelo PhD  
University of Vigo  
remigio.paradelo@uvigo.es

Opposed Reviewers:







Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente  
División de Edafología y Química Agrícola

October 6, 2015

Dear Editor,

Please find enclosed the original of the manuscript entitled "*Sustainable management of pig slurry using different composting scenarios: assessment of the organic matter changes*", for possible publication in the journal SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT.

The files are the following:

Manuscript: Manuscript Martin-Mata et al.doc

Tables and figures in: Table 1; Table 2; Table 3; Table 4; Figure 1; Figure 2; Figure 3; Figure 4; Figure 5; Figure 6

Figure captions: Figure captions.doc

Supplementary material: Supplementary Materials.doc

Graphical abstract: Graphical Abstract.tiff

**1. Submission of the work**

**All authors of this work:**

J. Martin-Mata      C. Lahoz-Ramos  
M.A. Bustamante   F.C. Marhuenda-Egea  
R. Moral            A. Santos  
J.A. Sáez            M.P. Bernal

**agree to submit this work to the journal Science of the Total Environment and certify that this work has not been published/submitted or being submitted to another journal.**

**2. Novelty and significant contribution of the paper**

All the authors confirm the novelty and significant contribution of this work, and of great interest for the audience of this journal, since its main purpose is to study the management of pig slurry by composting in different scenarios, evaluating the process using instrumental techniques (thermal analysis, solid-state NMR and FT-IR spectroscopy), as innovative techniques to assess the transformation of the organic matter during composting. The results obtained constitute a valuable information concerning the changes in the C pools and the identification of compounds that can act as "signalling" compounds to follow organic matter changes, aspects of great importance to evaluate the development of the composting process and the stability and maturity of the end-products obtained.

**3. Transference of the copyright**

In consideration of the publication of my contribution in the journal Science of the Total Environment, I hereby assign to this journal the present copyright. This transfer includes the right to adapt the article for use with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems.

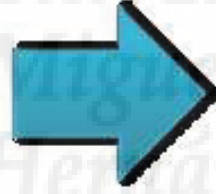
Looking forward to hearing from you.

Yours faithfully,

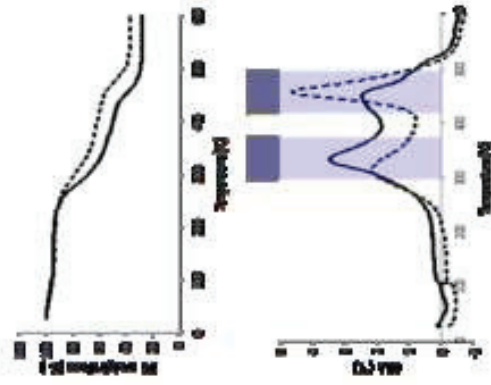
Dra. María Ángeles Bustamante  
e-mail: [marian.bustamante@umh.es](mailto:marian.bustamante@umh.es)

Carretera de Beniel, km. 3,2 03312 Orihuela (Alicante) ESPAÑA – Spain  
Tfno: 96 6749655 – Fax 96 6749711

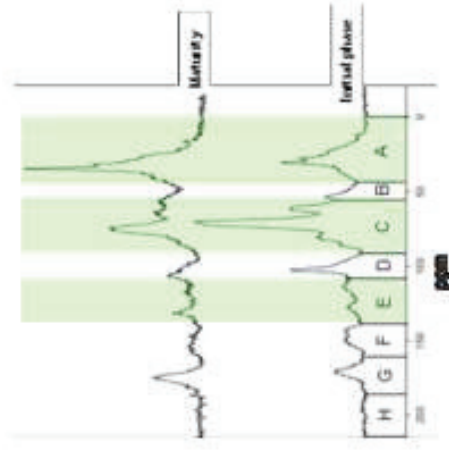
Sustainable management of pig slurry by composting:  
OM changes assessment



**Thermal analysis**



**Solid-state CPMAS <sup>13</sup>C NMR**



**FT-IR**



**\*Highlights (for review)**

**Highlights**

Thermal analysis, IR-TF and NMR can be used to assess OM changes during composting.

FT-IR, useful technique to follow OM biotransformations by 'signaling' compounds.

NMR and FT-IR showed powerful capacities to understand the evolution of C pools.

Composting system effect on OM changes was only detected by these techniques.



1

1

2

3

2

4

5

6

3

7

8

9

4

10

11

12

13

5

## **Sustainable management of pig slurry using different composting**

14

15

6

### **scenarios: assessment of the organic matter changes**

16

17

18

19

7

J. Martín-Mata<sup>a</sup>, C. Lahoz-Ramos<sup>b</sup>, M.A. Bustamante<sup>a</sup>, F.C. Marhuenda-Egea<sup>b</sup>, R. Moral<sup>a</sup>,

20

21

8

A. Santos<sup>c</sup>, J.A. Sáez<sup>c</sup>, M.P. Bernal<sup>c</sup>

22

23

24

9

<sup>a</sup>Department of Agrochemistry and Environment, Miguel Hernandez University, EPS-

25

26

10

Orihuela, Ctra Beniel Km 3.2, 03312-Orihuela (Alicante), Spain.

27

28

29

11

<sup>b</sup>Department of Agrochemistry and Biochemistry. University of Alicante, Apartado 99,

30

31

12

E-03080 Alicante, Spain.

32

33

34

13

<sup>c</sup>Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, Centro de

35

36

14

Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, PO Box 164, 30100 Murcia, Spain

37

38

39

15

40

41

16

42

43

Corresponding author: M.A. Bustamante

44

45

Phone: +34 966749655 Fax: +34 966749710

46

47

E-mail address: marian.bustamante@umh.es

48

49

20

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

21 **Abstract**

22 In this work, the association of different analytical techniques (thermal analysis, <sup>13</sup>C  
23 cross polarization magic angle spinning (CPMAS) NMR and Fourier transform infrared  
24 (FT-IR) spectroscopy) has been used to study the organic matter changes during the co-  
25 composting of pig slurry with cotton gin waste, developed in several scenarios, with  
26 different proportions of the raw materials and different type of composting system used.  
27 Also, the thermal stability index (R1) has been determined before and after a water-  
28 extraction method to eliminate water-soluble inorganic salts, to evaluate the effect of  
29 this procedure in the samples prior to thermal analysis. The results of the thermal  
30 methods showed the degradation of the most labile organic matter during composting;  
31 R1 increased in all cases, without showing any influence on the presence of water-  
32 soluble inorganic ions in the sample. NMR showed during composting a decrease of the  
33 carbohydrate molecules and an increase of the aliphatic materials due to a concentration  
34 effect. Also, FT-IR spectroscopy was a useful technique to study the trend of  
35 polysaccharides and nitrates as compounds indicative of organic matter transformations  
36 during composting.

37  
38 **Keywords:** pig slurry, organic matter, compost, <sup>13</sup>C-NMR, FT-IR, thermal analysis.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 39 1. Introduction

40 In Europe, during the last 20 years, pig farms have been increasing in size,  
41 concentrating the activity in certain areas (Burton et al., 2003), which frequently leads  
42 to an accumulation of manure in areas without enough agricultural land for its recycling  
43 in the soil-plant system. Pig slurry is rich in organic matter (OM) and beneficial plant  
44 nutrients, mainly nitrogen and phosphorous (Moral et al., 2005), but also it presents  
45 several characteristics, such as pathogens and unpleasant odours, among others, which  
46 limit its direct agricultural use, and safe transport to land.

47 Composting is a friendly environmental and economical alternative and a value  
48 enhancement strategy for treating organic wastes, also obtaining a stabilised, mature,  
49 deodorised, hygienic product, free of pathogens and plant seeds, and rich in humic  
50 substances that is easy to store and marketable as organic amendment or fertiliser  
51 (Bernal et al., 2009). However, compost quality and stability strongly depend on the  
52 properties of the raw materials, the time of composting and the oxidative conditions of  
53 treatment, which influence microbial activities, resulting in different degrees of  
54 degradation and transformation of the initial organic mixtures (Fuentes et al., 2007).

55 Therefore, the understanding of organic matter transformations throughout the  
56 composting process is an essential aspect for successful utilisation of composts.

57 During composting, labile organic compounds, such as simple carbohydrates, fats and  
58 aminoacids, are degraded quickly in the first stage of composting; other, more resistant  
59 organic substrates, such as cellulose, hemicellulose and lignin are partially degraded and  
60 transformed at a lower rate. Therefore, composting involves a partial mineralisation of  
61 the organic substrate, leading to carbon losses throughout the process; this is  
62 compensated by the high stabilisation degree of the remaining organic compounds  
63 (Bernal et al., 2009). Also, during the humification process, singular structural changes

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

64 and features occur, these changes being classically attributed to increases in aromatic  
65 content in humic substances, although other studies have shown that the accumulation  
66 of recalcitrant aliphatic structures also takes place during composting (Almendros et al.,  
67 2000). This shows that the evaluation of the real degree of the organic matter evolution  
68 during composting is complicate and requires a wide and complete knowledge of the  
69 processes and of the factors that condition the transformation of the organic matter.  
70 Therefore, the association of thermal and spectral techniques can be an accurate way to  
71 complement the chemical methods and to provide a precise knowledge of the processes  
72 involved during the changes that organic matter undergo throughout the composting  
73 process.

74 Thermal analysis (TA) has been proposed as a method to characterise the organic matter  
75 of composted materials and of humic and fulvic acids of different origin and nature  
76 (Drussi et al., 2009; De Oliveira et al., 2002), as well as of biomass (Mothè et al., 2009;  
77 Dos Reis Orsini et al. 2011) and soil organic matter (Barros et al., 2011; Fernández et  
78 al., 2011). Thermal techniques, such as thermogravimetry (TG), derivative  
79 thermogravimetry (DTG) and differential thermal analysis (DTA), have been applied as  
80 a reproducible, informative and rapid, low-cost and small-sample consuming method to  
81 elucidate structural features of heterogeneous organic matter (Smidt and Lechner,  
82 2005), providing important information about the chemical characteristics of the sample  
83 and about the progressive biodegradation of biopolymers during the compost process  
84 (Provenzano et al., 2000; Otero et al., 2002). However, several interferences related to  
85 the catalytic role of ammonia salts should be taking in to account. In this sense, Blanco  
86 and Almendros (1994) suggested comparative studies with bulk and washed samples.  
87 Solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy with cross-polarization and  
88 magic angle spinning (CPMAS NMR) has a great strength to provide information about

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

89 the carbon molecules in a complex sample without any chemical or physical  
90 fractionation (Preston, 1996; Preston et al., 1998). This technique can be used to detect  
91 C types, such as carbohydrates and alkyl, aromatic, or carboxyl carbons for complex  
92 samples (Almendros et al., 2000; Pichler et al., 2000; Chen, 2003; Castaldi et al., 2005;  
93 Tang et al., 2006; Gómez et al., 2007). The integration of the CP-MAS spectra of the  
94 compost samples showed that the modification of the carbon distributions is related to  
95 the transformation of the organic matter during the composting process. The fundament  
96 of FT-IR is the interaction of infrared light with matter, and it is sensitive to the  
97 chemical functional groups present in the sample (Smith, 1999). FT-IR has similar  
98 advantages respect the sample preparation and relatively lower cost than thermal  
99 analysis.

100 Therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of the association of thermal  
101 analysis and spectral techniques to identify organic matter changes throughout the  
102 management of pig slurry by co-composting with cotton gin waste in different  
103 conditions, according to the proportion of the raw materials and to the type of  
104 composting system used.

## 106 **2. Materials and methods**

### 107 *2.1. Experimental procedure*

108 Three piles (P1, P2 and P3) were prepared using the solid fraction of pig slurry (SFP)  
109 coming from two different pig farms, and cotton gin waste (CW) as bulking agent,  
110 using different composting systems (static pile with forced aeration and turning  
111 composting system). The SFP of P1 and P2 was collected from a fattening farm located  
112 in Orihuela (Alicante, Spain) (SFP1) and that of P3 (SFP2), from a sows and piglets  
113 farm in Guazamara (Almería, Spain), after a solid-liquid separation using a screw-press



114 (without flocculants) in both cases, and CW was collected from a cotton industry in  
115 Seville (Spain). The main characteristics of the starting materials were: moisture 76.5%,  
116 pH 7.4, 1.26 dS m<sup>-1</sup> for EC, 69.4% OM, 33.5% total organic carbon (TOC) and 1.90%  
117 total nitrogen (TN), for SFP1; moisture 85.8%, pH 6.8, 3.00 dS m<sup>-1</sup> for EC, 80.5% OM,  
118 39.0% TOC and 2.84 % TN, for SFP2; and moisture 8.2%, pH 7.6, 3.80 dS m<sup>-1</sup> for EC,  
119 81.0% OM, 40.7% TOC and 2.18% TN, for CW.

120 The piles P1, P2 and P3 were elaborated in the proportions of SFP: CW (v:v, fresh mass  
121 basis): 4:3, 3:4 and 3:1, respectively, in order to compost the maximum weight of SFP  
122 with a sufficient amount of CW, as bulking agent. Piles P1 and P2 (2000 kg fresh  
123 weight) were composted by the Rutgers static pile composting system, with forced  
124 aeration on temperature demand, which maintains a temperature ceiling (65 °C) in the  
125 pile, involving on-demand ventilation through temperature feedback control. In P1 and  
126 P2, the bio-oxidative phase lasted for 103 days and during this period, both piles were  
127 turned twice, when the temperature inside the piles started to decrease, in order to  
128 homogenize the mixture and improve the composting process (Figure 1).

129 The mixture P3 was elaborated using the turning system in a trapezoidal pile (19.2 m<sup>3</sup>)  
130 in the pig farm. Thermophilic temperatures occurred during 70 days, reaching values  
131 higher than 60°C (Figure 1). The bio-oxidative phase lasted for 146 days, during which  
132 the pile was turned five times.

133 In all piles, the bio-oxidative phase of composting was considered finished when the  
134 temperature of the piles was stable and near to that of the atmosphere. Then, all the piles  
135 were allowed to mature for 2 months. The moisture of the piles was controlled weekly  
136 by adding the necessary amount of water to keep the moisture at a value > 40 %. The  
137 samples were taken by mixing seven sub-samples from seven sites of the pile, from the  
138 whole profile (from the top to the bottom of the pile). The sampling was made at the

139 beginning of the process at day 0 (initial sample – I), two times at the thermophilic  
140 phase (beginning – BT and advanced thermophilic – T), at the end of the bio-oxidative  
141 phase (EB) and after the maturation period (M).

142

## 143 *2.2. Chemical analysis*

144 Total organic carbon (TOC) and total-N (TN) were determined by automatic  
145 microanalysis. Organic matter (OM) was calculated by loss-on ignition at 550 °C for 24  
146 h. Water-soluble organic carbon ( $C_w$ ) was determined in a water extract of 1:10 (w/v),  
147 after filtration through a synthetic filter with a pore diameter of 0.45  $\mu\text{m}$ , by using an  
148 automatic analyzer for liquid samples (TOC-V CSN Analyzer, Shimadzu). Humic-like  
149 fractions (0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH-extractable organic carbon ( $C_{EX}$ ), fulvic acid-like carbon  
150 ( $C_{FA}$ ), and humic acid-like carbon ( $C_{HA}$ ) were also determined, using an automatic  
151 carbon analyzer for liquid samples (TOC-V CSN Analyzer, Shimadzu). The  
152 humification ratio (HR), the humification index (HI), the percentage of humic acid-like  
153 carbon ( $P_{HA}$ ) and the polymerization index ( $P_i$ ) were calculated as  $(C_{EX}/C_{org}) \times 100$ ;  
154  $(C_{HA}/C_{org}) \times 100$  and  $(C_{HA}/C_{EX}) \times 100$  and  $C_{HA}/C_{FA}$ , respectively. All parameters were  
155 determined in triplicate and according to the methods described in Bustamante et al.  
156 (2012).

157

## 158 *2.3. Thermal and spectral analysis*

159 Samples were air-dried, ground in an agate mill, then sieved through a 0.125 mm mesh,  
160 and milled again with a mortar with liquid N<sub>2</sub>. Thermal analyses were performed with a  
161 Mettler Toledo (TGA/SDTA851e/LF/1600) and Pfeiffer Vacuum (Thermostar  
162 GSD301T) mass spectrometer that enables the recording of thermograms and mass  
163 spectra of combustion gases simultaneously. All samples were combusted with a mixing

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

164 stream of oxygen/He (20/80%), a gas flow 100 ml min<sup>-1</sup> within a temperature range  
165 from 25 to 650 °C, a heating rate 10 °C min<sup>-1</sup>, a sample weight about 6-7 mg, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
166 pan, and self-controlled calibration.  
167 In order to evaluate the effect of removing the compost water-soluble fraction in  
168 thermal analysis (Blanco and Almendros, 1994), 1 g of compost was suspended in 20  
169 ml of water overnight with shaking. After centrifugation, the compost insoluble fraction  
170 was dried and ground in an agate mortar. Thermal analyses were carried out with the  
171 original compost samples and with the compost samples after the water-extraction  
172 process of the soluble fraction.  
173 CPMAS <sup>13</sup>C NMR experiments were performed on a Bruker Advance DRX500  
174 operating at 125.75 MHz for <sup>13</sup>C. Samples were packed into a 4 mm diameter  
175 cylindrical zirconia rotor with Kel-F end-caps and spun at 10000 ± 100 Hz. A  
176 conventional CPMAS pulse sequence (Wilson, 1987) was used with a 1.0 ms contact  
177 time. Between 2000 and 5000 scans were accumulated with a pulse delay of 1.5 s. Line  
178 broadening was adjusted to 50 Hz. Spectral distributions (the distribution of total signal  
179 intensity among various chemical shift ranges) were calculated by integrating the signal  
180 intensity in seven chemical shift regions: carbonyl (210–165 ppm), O-aromatic  
181 (165–145 ppm), aromatic (145–110 ppm), O<sub>2</sub>-alkyl (110–95 ppm), O-alkyl (95–60  
182 ppm), N-alkyl/methoxy (60–45 ppm), and alkyl (45 to –10 ppm) (Nelson and Baldock,  
183 2005). The labels indicate only major types of C found in each region.  
184 The FT-IR spectra were collected on a Bruker IFS 66 spectrometer. The resolution was  
185 set to 4 cm<sup>-1</sup>, and the operating range was 400–4000 cm<sup>-1</sup>. Samples (7–10 mg) were  
186 mixed with 100 mg of dried KBr, and then the mixture was pressed into pellets. In all  
187 cases, 20 scans per sample were recorded, averaged for each spectrum, and corrected  
188 against the spectrum with ambient air as background.

189

190 *2.4. Statistical analysis*

191 The one-way analysis of variance (ANOVA) and least significant difference (LSD) test  
192 at  $P < 0.05$  were used to assess the significant differences among the values of each  
193 parameter studied during composting. The two-way analysis of variance (two-way  
194 ANOVA) and Tukey HSD test ( $p < 0.05$ ) were used to assess the significant differences  
195 among the results of thermal analysis (T50 and R1) throughout the process. Normality  
196 and homogeneity of the variances were checked using the Shapiro-Wilk and Levene  
197 test, respectively, before ANOVA. The standard error of the mean values of each  
198 parameter was also determined. Also, the Pearson regression analysis was carried out  
199 between the thermostability index (R1) and classical parameters (OM, TOC, Cw, TN  
200 and TOC/TN ratio) usually used to study organic matter changes during composting.  
201 Data analysis was carried out using the SPSS v. 19.0 statistical software package.

202

203 **3. Results and discussion**

204 *3.1 Development of the composting process*

205 All the piles showed a typical composting temperature profile, reaching thermophilic  
206 temperatures ( $> 40^{\circ}\text{C}$ ) during the first two weeks of composting, due to the microbial  
207 proliferation, and maintaining the thermophilic phase during more than two months  
208 (Fig. 1). For P1 and P2, the thermophilic phase was longer and the temperature values  $>$   
209  $40^{\circ}\text{C}$  were reached faster than in P3. Several studies of composting of manures have  
210 reported the lack of differences in the temperature profile due to the type of composting  
211 system used (Solano et al., 2001). Then, the differences observed could be due to the  
212 different characteristics of the solid fraction of pig slurry used, such as the initial highest

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

213 moisture concentration of P3 (72.5 %), with respect to P1 (46.7 %) and P2 (63.7 %),  
214 which could have influenced the porosity and aeration of the mixture.  
215 During composting, the OM concentration decreased 28%, 22% and 17 % in P1, P2 and  
216 P3, respectively, due to the microbial degradation of the labile organic compounds  
217 (Table 1). These led to OM losses (calculated by mass balance, taking into account the  
218 weight loss of the pile) that reached 64.4%, 50.5% and 54.7 % of OM in P1, P2 and P3,  
219 respectively. Most of the OM losses occurred at the beginning of the process, with the  
220 highest temperature values, which is indicative of the rapid decomposition of the readily  
221 biodegradable substrates and a high rate of microbial activity (Bustamante et al., 2012).  
222 Afterwards, a second stage was observed with low rate of OM loss, indicating the most  
223 resistant compounds to microbial activity degradation, such as polymers like lignin,  
224 remained in the mixture, which suggests that the OM content in the product became  
225 highly stabilised. This behaviour in OM degradation during composting of animal  
226 manure has been frequently observed in other studies (Paredes et al., 2000; Bustamante  
227 et al., 2012; Brito et al., 2012).  
228 The concentrations of TOC and  $C_w$  decreased as the composting process progressed  
229 (Table 1). According to Bernal et al. (2009), TOC tends to decrease during composting  
230 due to the mineralisation of the OM caused by microbial degradation of the most labile  
231 forms of TOC, such as  $C_w$ . Similar results were reported by Nolan et al. (2011) and  
232 Szanto et al. (2007) when composting the solid fraction of pig slurry with several  
233 bulking agents. Furthermore, an increase of 49, 16 and 33 % in the TN concentration  
234 was found for P1, P2 and P3, respectively, during the composting period. This increase  
235 can be due to a concentration effect caused by the reduction of the compost mass and/or  
236 N-immobilisation processes (Bustamante et al., 2012). Similar results were found by  
237 Huang et al. (2001) when composting the pig slurry with leaves, where an increase in

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

238 TN concentration was observed throughout the composting process. Then, the TOC/TN  
239 ratio decreased during the composting process, with the values reaching the limit value  
240  $< 12$ , indicative of an acceptable degree of maturity (Bernal et al., 2009).  
241 Several parameters, such as the concentrations of the different C fractions ( $C_{EXT}$ ,  $C_{HA}$   
242 and  $C_{FA}$ ) and the humification indices (HI, HR,  $P_{HA}$ ,  $P_I$ ) have been used in different  
243 studies to evaluate organic matter humification and compost maturity (Bernal et al.,  
244 2009). The composts obtained from P1 and P3 showed higher concentrations of  $C_{HA}$   
245 than the compost from P2 ( $P1 = 17.5 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $P2 = 9.7 \text{ g kg}^{-1}$  and  $P3 = 18.1 \text{ g kg}^{-1}$ ), while  
246 the lowest concentration of  $C_{FA}$  occurred in P3 ( $P1 = 16.3 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $P2 = 15.1 \text{ g kg}^{-1}$  and  $P3$   
247  $= 11.3 \text{ g kg}^{-1}$ ).  
248 Regarding the humification indices, the highest values of these parameters were also  
249 observed in the composts with the highest proportion of SFP, P1 and P3 (HR: 10.7%,  
250 9.27%, 10.2% for P1, P2 and P3, respectively; HI: 5.78%, 3.61% and 6.27% for P1, P2  
251 and P3, respectively;  $P_{HA}$ : 54.2%, 39.0% and 61.3%, for P1, P2 and P3;  $P_I$ : 1.08, 0.64  
252 and 1.60 for P1, P2 and P3, respectively). However, all the composts showed values of  
253 these parameters higher than those established by different authors as indicative of  
254 compost maturity (Bernal et al., 2009).

### 256 *3.2 Thermal analysis*

257 The TG curves (Figure 2) showed the typical combustion process of organic matter in a  
258 compost sample (Blanco and Almendros, 1994; Smidt and Lechner, 2005; Marhuenda-  
259 Egea et al., 2007). All the piles had a similar behaviour in the combustion process  
260 between 25 °C and 600 °C, showing an increase in the percentage of the inorganic  
261 residual fraction after the combustion process, related to the time of composting, also  
262 coinciding with the OM decrease (Table 1). The increase of the remaining inorganic

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

263 fraction associated to the composting process (mature vs. initial samples) was lower for  
264 P1 compared to P2 and P3, in the unwashed (8.9, 23.0 and 21.4 %, respectively) and  
265 washed samples (15.7, 22.6 and 16.9 %, respectively).  
266 The DTG curve shape was determined by the combustion of different organic  
267 compounds when the temperature increased (Figure 3). The weight loss in the  
268 temperature range between 25 and 105 °C can be attributed to the loss of water.  
269 Dehydration within this range of temperature was also reported in other studies (Smidt  
270 and Lechner, 1994; Melis and Castaldi, 2004; Marhuenda-Egea et al., 2007). This  
271 dehydration is an endothermic process. Therefore, in order to minimise the effect of the  
272 endothermic process with the combustion of the organic matter at higher temperatures  
273 (exothermic process), a time of 10 min at 105 °C was included in the thermogravimetry.  
274 After this region of the DTG curve, two different regions can be distinguished: a first  
275 region, between 200 °C and 430 °C, and a second region, between 430 °C and 580 °C.  
276 The first region can be attributed to the combustion of the more labile organic matter  
277 (probably carbohydrates, simple lipids and amino acids) (Rovira et al., 2008; Ali et al.,  
278 2012). The combustion of the more stable organic matter (such as aromatic compounds  
279 and polyphenols) was the cause of the weight loss in the second region (Blanco and  
280 Almendros, 1994, Rovira et al., 2008). The range between 350-500 °C has been also  
281 attributed by different authors (Smidt et al., 2005; Ali et al., 2012) to the degradation of  
282 complex aromatic structures, such as the humified organic matter. Thus, the samples  
283 with a higher degree of stabilisation use more energy for decomposition, e.g. to achieve  
284 the same mass losses, these samples require higher temperatures, as a consequence of  
285 the higher content in highly complex aromatic compounds compared to the initial ones,  
286 indicating OM stabilisation throughout the composting process.

1 287 The shape of the DTG curves showed differences between the samples before and after  
2 288 the water-extraction process (Figure 3). Similar DTG curves were obtained for the other  
3  
4 289 piles (see Supplementary Material). The presence of water-soluble inorganic salts in the  
5  
6 290 compost samples can modify the curve shape, by the catalytic effect of these inorganic  
7  
8 291 salts in the combustion process (Blanco and Almendros, 1994). The probable catalytic  
9  
10 292 effect of these inorganic salts also shifted the peaks in the DTG curves toward higher  
11  
12 293 temperatures, i.e., for the pile P1 the maximum temperature peak in the first region  
13  
14 294 shifted from 276 °C to 292 °C, comparing the sample before and after the water  
15  
16 295 extraction. Other temperatures are shown in the Supplementary Material. The  
17  
18 296 sharpening of the peaks was more evident in the region at the highest temperatures  
19  
20 297 (between 430 and 580 °C). This sharpening covered up the combustion of a molecular  
21  
22 298 diversity in the compost samples before the water extraction process, since the peaks in  
23  
24 299 the DTG curves of the water-extracted samples suggested the presence of this molecular  
25  
26 300 diversity (Figure 3) (Blanco and Almendros, 1994). So, in the DTG curve of the sample  
27  
28 301 after water-extraction at the end of the composting process three wide peaks can be  
29  
30 302 distinguished (Figure 3).  
31  
32 303 The transformation of the organic matter during the composting process can be assessed  
33  
34 304 by thermogravimetry, independently of the shape of the curves. If the area below the  
35  
36 305 DTG curve in the different regions is determined, it is possible to obtain similar values  
37  
38 306 in the original samples and in the water-extracted samples (Table 2). Therefore, it seems  
39  
40 307 that the amount of the organic matter burned in the two regions of the temperatures was  
41  
42 308 not conditioned by the catalytic effects of the water soluble salts. With these areas, the  
43  
44 309 thermostability index (R1) can be calculated, which is the ratio between the mass losses  
45  
46 310 associated with the two main exothermic peaks (Table 2). The thermostability index  
47  
48 311 (R1) can be used to evaluate the transformation of the organic matter during the  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

312 composting process (Rovira et al., 2008). This relation between the mass losses in the  
313 two exothermic peaks increased in the three piles (Table 2). The increase of R1 in the  
314 composting process showed the high sensitivity of this parameter to the chemical  
315 changes induced by the bio-transformation of the organic materials in the composting  
316 piles, indicating the relative amount of the most thermally-stable fraction of the organic  
317 matter with respect to the less stable one. In the same way, the values of the R1 in the  
318 maturation stages of the composting process reached stable values, suggesting a good  
319 stability of the organic compounds in the composting pile. Statistically, the ANOVA  
320 analysis showed significant differences ( $P < 0.001$ ) between the initial samples and the  
321 rest of the samples (Table 2), decreasing those differences in the thermophilic samples  
322 and at the end of the bio-oxidative and after maturation phases (the two last ones  
323 without statistical differences).  
324 The ANOVA analysis did not find any significant difference between R1 of the samples  
325 before and after water extraction ( $P > 0.05$ ; Table 2). As the water-extraction process did  
326 not have any effect on the R1 values, then, R1 can be used to evaluate the composting  
327 process without eliminating the catalytic effect of the water-soluble ions (Table 2). In  
328 this sense, if the T50 (temperature at which 50% organic matter was burning) is  
329 considered (Rovira et al., 2008), the differences between the samples after and before  
330 the water-extraction process were scarce. The T50 increased for all piles during the  
331 composting process (Table 2). Statistically, only the initial samples had a lower T50  
332 value than the rest of the samples; while in the samples after water-extraction the  
333 increase with composting was statistically significant. However, the water-extraction  
334 was not a statistically significant factor for the T50 results at the different composting  
335 times. Also, a Pearson regression analysis was carried out between R1 and the classical  
336 parameters usually used to estimate OM changes (OM, TOC, Cw, TN and TOC/TN

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

337 ratio). Strong inverse correlations between R1 and such parameters were observed,  
338 indicating that recalcitrant organic matter was related to higher R1 values (Pearson  
339 correlation coefficient values = -0.88, -0.88, -0.94 and -0.90 vs. OM, TOC, C<sub>w</sub> and  
340 TOC/TN, respectively in the unwashed samples; and -0.94, -0.97, -0.96 and -0.94 vs.  
341 OM, TOC, C<sub>w</sub> and TOC/TN, respectively in the washed samples).  
342 The DTA profiles showed different endothermic and exothermic peaks (Figure 4).  
343 These peaks were associated with the peaks in the DTG curves. The endothermic peak  
344 around 98 °C corresponded to the dehydration process. The other two exothermic peaks  
345 in the region between 200 °C to 430 °C and in the region between 430 °C to 580 °C were  
346 associated to the combustion process of the organic matter (Rovira et al., 2008;  
347 Martínez-Sabater et al., 2009). The thermal degradation of carbohydrates and other  
348 labile molecules, related to the first exothermic peak in DTA curves, was higher in the  
349 initial samples and decreased throughout the composting process. This feature coincided  
350 with the decrease of O-alkyl C percentage (see NMR spectroscopy section). In this  
351 experiment, the second exothermic peak was associated to the combustion of more  
352 recalcitrant compounds, confirmed by the significant increase of alkyl C percentage  
353 during composting. The shape of the DTA curves was different for samples before and  
354 after the water -extraction process, such as the shape of the DTG curves showed (Figure  
355 4). Also, the possible catalytic effect of the water-soluble ions in the exothermic  
356 reactions can be observed in the sharpening of the peaks.

357

### 358 *3.3 NMR spectroscopy*

359 The solid-state CPMAS <sup>13</sup>C NMR spectra of the compost samples at the different  
360 composting stages are displayed in Figure 5. The presence of materials from vegetal  
361 origin in the compost piles was clear by the visual inspection of the spectra. The spectra

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

362 were dominated by the peaks around to 73 ppm, this peak being attributed to  
363 carbohydrates (cellulose and hemicellulose) (Nelson and Baldock, 2005). The <sup>13</sup>C NMR  
364 spectra were divided in different chemical shift regions, such as it was reported by  
365 Nelson and Baldock (2005): carbonyl (210-165 ppm), O-aromatic (165-145 ppm),  
366 aromatic (145-110 ppm), O<sub>2</sub>-alkyl (110-95 ppm), O-alkyl (95-60 ppm), N-  
367 alkyl/methoxy (60-45 ppm), and alkyl (45 to -10 ppm). These divisions were dominated  
368 by types of C present in the different regions, although there were overlapping between  
369 the C types (Nelson and Baldock, 2005). The integration of the different chemical shift  
370 regions was obtained in order to follow the biotransformation of the organic matter in  
371 the composting piles (Table 3). The O-alkyl (D) region decreased, suggesting  
372 carbohydrate degradation during the composting process. For pile P3, a decrease was  
373 also observed in all the chemical shift regions (Fig. 5). The C types in other regions  
374 increased in the contribution to the spectra by a concentration effect throughout the  
375 composting process. Moreover, especial attention must be paid to the alkyl region  
376 (column A, Table 3), which mainly includes the most recalcitrant carbon pools. In this  
377 experiment, the relative intensity of alkyl C increased significantly during the  
378 composting process (e.g. 13 to 35 % in P1, 19 to 34 % in P2), coinciding this fact with  
379 the enrichment in recalcitrant compounds detected with the thermal analysis. Martínez-  
380 Sabater et al. (2009) also found an increase between initial and matured samples from  
381 10 to 15 % in related experiments using winery and distillery wastes.  
382 The evolution of the relative intensity between the most stable C fractions associated to  
383 alkyl region, and the labile C fractions, associated to O-alkyl region (carbohydrate and  
384 related molecules) is shown in Table 3. This ratio decreased for the piles P1 and P2, but  
385 it showed an erratic behaviour for the pile P3, indicating different patterns of  
386 biotransformation, which could be caused by the different SFP used and the different

1 387 management during the composting process, since P1 and P2 were prepared using the  
2 388 static pile system with forced aeration and P3 was elaborated by the turning composting  
3  
4 389 system, thus, carrying out periodical whirls (see Material and Methods section). This  
5  
6  
7 390 can be also observed only with a visual inspection of the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of each  
8  
9 391 composting pile, P3 showing lower intensity of the signals in the carbonyl (210-165  
10  
11 392 ppm), O-aromatic (165-145 ppm), and aromatic (145-110 ppm) regions.  
12  
13

14 393

#### 15 394 *3.4 FT-IR spectroscopy*

16  
17 395 FT-IR spectra were used in order to evaluate the transformation of the organic and  
18  
19 396 inorganic materials throughout the composting process. Only carrying out a visual  
20  
21  
22 397 inspection of the FT-IR spectra, similar profiles were observed for all samples, which  
23  
24 398 shows that the variations of FT-IR spectra depending of the composting mixture were  
25  
26  
27 399 minor (Fig. 6). The changes in the functional chemical groups were followed in the FT-  
30  
31 400 IR spectra measuring the relative intensity of the absorbance bands (Martínez-Sabater et  
32  
33 401 al., 2009). The relative intensity of the select absorbance bands is shown in Table 4. In  
34  
35 402 accordance to the biodegradation of organic matter, significant increases in the band at  
36  
37 403  $1384\text{ cm}^{-1}$  (band assigned to nitrates), and decreases in the bands at  $2920\text{ cm}^{-1}$  and at  
38  
39 404  $1050\text{ cm}^{-1}$  (assigned to the aliphatic C-H vibrations and to polysaccharides,  
40  
41  
42 405 respectively) were observed. Grube et al. (2006) also referenced the changes in the band  
43  
44 406 at  $2920\text{ cm}^{-1}$  as an effective way to assess the biotransformation of organic matter  
45  
46 407 during composting. The region between  $2930\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$  could be attributed to aliphatic  
47  
48 408 groups in fatty acids (Fialho et al., 2010) and its stationary behaviour during the  
49  
50 409 composting indicated the presence of vegetable material highly resistant to  
51  
52 410 microbiological degradation, probably associated to molecules of vegetable origin like  
53  
54 411 cutines, suberines or lignins (Marhuenda-Egea et al., 2007). The ratio between the  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

412 intensity of the bands of polysaccharides ( $1050\text{ cm}^{-1}$ ) and nitrates ( $1384\text{ cm}^{-1}$ ) decreased  
413 for all the piles with the time of composting and additionally was directly correlated  
414 with the C:N ratio (Table 4). However, the decrease for the pile P3 was different from  
415 those shown in piles P1 and P2, due to a different trend of organic matter  
416 transformation, this fact being also confirmed in the results obtained with the  $^{13}\text{C}$  NMR  
417 spectra.

418

#### 419 **4. Conclusions**

420 Thermogravimetric methods and classical analytical approaches seemed to be very  
421 synergic obtaining good correlations between thermostability index (R1) and C related  
422 parameters. NMR and FT-IR showed more powerful capacities to understand the  
423 evolution of C pools especially when recalcitrant C vs labile C pools are compared, e.g.  
424 Alkyl /O-Alkyl ratio. FT-IR spectroscopy was also more useful to follow the evolution  
425 of polysaccharides and nitrates as 'signaling' compounds of the organic matter  
426 biotransformation than classical techniques. The composting system seemed to produce  
427 differences in OM changes only detected by instrumental analysis, which can be also  
428 used to discriminate quality aspects in mature composts.

429

#### 430 **5. Acknowledgements**

431 The research has been carried out in the framework of the EU Life+ project MANEV  
432 Evaluation of manure management and treatment technology for environmental  
433 protection and sustainable livestock farming in Europe (LIFE09 ENV/ES/000453) and  
434 also by the People Programme (Marie Curie Actions) ReUseWaste of the European  
435 Union's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013/ under REA grant agreement  
436 n° 289887, and the results and conclusions achieved reflect only the author's view - the

1  
2 437 Union not being liable for any use that may be made of the information contained  
3 438 therein.

4  
5 439

6  
7 440 **6. References**

8  
9 441 Ali, M., Bhatia, A., Kazmi, A.A., Ahmed, N., 2012. Characterization of high rate

10  
11 442 composting of vegetable market waste using Fourier transform-infrared (FT-IR)

12  
13 443 and thermal studies in three different seasons. *Biodegradation* 23, 231–242.

14  
15 444 Almendros, G., Dorado, J., Gonzáles-Vila, F. J., Blanco, M. J., Lankes, U., 2000. <sup>13</sup>C

16  
17 445 NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and

18  
19 446 shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 793-804.

20  
21 447 Barros, N., Salgado, J., Villanueva, M., Rodriquez-Añón, J., Proupin, J., Feijoó, S.,

22  
23 448 Martín-Pastor, M., 2011. Application of DSC–TG and NMR to study the soil

24  
25 449 organic matter. *J. Therm. Anal. Calorim.* 104(1), 53–60.

26  
27 450 Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and

28  
29 451 chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour.*

30  
31 452 *Technol.* 100, 5444–5453.

32  
33 453 Blanco, M.J., Almendros, G. J., 1994. Maturity assessment of wheat straw composts by

34  
35 454 thermogravimetric analysis. *Agric. Food Chem.* 42, 2454-2459.

36  
37 455 Brito, L.M., Mourão, I., Coutinho, J., Smith, S.R. (2012). Simple technologies for on-

38  
39 456 farm composting of cattle slurry solid fraction. *Waste Manage.* 32(7):1332-1340.

40  
41 457 Burton, H., Turner, C., 2003. *Manure management, Treatment Strategies for*

42  
43 458 *Sustainable Agriculture* (second ed.) Silsoe Research Institute, Lister and

44  
45 459 Durling Printers, Flitwick, Bedford, UK.

46  
47 460 Bustamante, M.A., Albuquerque, J.A. Restrepo, A.P., de la Fuente, C., Paredes, C.,

48  
49 461 Moral, R., Bernal, M.P. 2012. Co-composting of the solid fraction of anaerobic

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

462 digestates, to obtain added-value materials in agriculture. *Biomass Bioenerg.* 43,  
463 26-35.

464 Castaldi, P., Alberti, G., Merella, R., Melis, P., 2005. Study of the organic matter  
465 evolution during municipal solid waste composting aimed at identifying suitable  
466 parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Manage.* 25, 209-213.

467 Chen, Y. N., 2003. Nuclear magnetic resonance, infra-red and pyrolysis: application of  
468 spectroscopic methodologies to maturity determination of composts. *Compost  
469 Sci. Util.* 11, 152-168.

470 De Oliveira, S.C., Provenzano, M., Santiago-Silva, M.R., Senesi, N., 2002. Maturity  
471 degree of composts from domestic solid wastes evaluated by differential  
472 scanning calorimetry. *Environ. Technol.* 23, 1099-1105.

473 dos Reis Orsini, R., Moscardini Filho, E., Pita Mercuri, L., do Rosario Matos, J., de  
474 Carvalho, F.M.S., 2011. Thermoanalytical study of inner and outer residue of  
475 coffee harvest. Applications on biomass. *J Therm Anal Calorim.* 106, 741–745.

476 Droussi, Z., Dorazio, V., Provenzano, M., Hafidi, M., Outmane, A., 2009. Study of the  
477 biodegradation and transformation of olive-mill residues during composting  
478 using FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *J. Hazardous  
479 Materials* 164, 1281-1285.

480 Fernández, J.M., Plante, A.F., Leifeld, J., Rasmussen, C., 2011. Methodological  
481 considerations for using thermal analysis in the characterization of soil organic  
482 matter. *J. Therm. Anal. Calorim.* 104(1), 389–398.

483 Fialho, L.L., da Silva, W.T.L., Milori, D.M.B.P., Simões, M.L., Martin-Neto, L., 2010.  
484 Characterization of organic matter from composting of different residues by  
485 physicochemical and spectroscopic methods. *Biores Technol.* 101, 1927–1934.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 486 Fuentes, M., Baigorri, R., González-Gaitano, G., García-Mina, J.M., 2007. The  
487 complementary use of <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, FTIR and size exclusion  
488 chromatography to investigate the principal structural changes associated with  
489 composting of organic materials with diverse origin. *Organic Geochem.* 38,  
490 2012–2023.
- 491 Gómez, X., Diaz, M. C., Cooper, M., Blanco, D., Morán, A., Snape, C.E., 2007. Study  
492 of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by  
493 thermogravimetric analysis and C-13 NMR. *Chemosphere* 68, 1889-1897.
- 494 Grube, M., Lin, J.G., Lee, P.H., Kokorevicha, S., 2006. Evaluation of sewage sludge-  
495 based compost by FT-IR spectroscopy. *Geoderma* 130, 324-333.
- 496 Huang, G.F., Fang, M., Wu, Q.T., Zhou, L.X., Liao, X.D., Wong, J.W.C, 2001. Co-  
497 composting of pig manure with leaves. *Environ. Technol.* 22:10 1203-1212.
- 498 Marhuenda-Egea, F.C., Martínez-Sabater, E., Jordá, J., Sánchez-Sánchez, A., Moral, R.,  
499 Bustamante, M.A., Paredes, C., Pérez-Murcia, M.D., 2007. Evaluation of the  
500 aerobic composting process of winery and distillery residues by thermal  
501 methods. *Thermochim. Acta* 454, 135-143.
- 502 Martínez-Sabater, E., Bustamante, M.A., Marhuenda-Egea, F.C., El-Khattabi, M.,  
503 Moral, R., Lorenzo, E., Paredes, C., Gálvez, L. and Jordá, J., 2009. Study of the  
504 evolution of organic matter during composting of winery and distillery residues  
505 by classical and chemometric analysis. *J. Agri. Food Chem.* 57, 9613-9623.
- 506 Melis, P., Castaldi, P., 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter  
507 evolution during municipal solid waste aerobic composting process.  
508 *Thermochim. Acta* 413 (1-2), 209-214.



- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 509 Moral, R., Perez-Murcia, M.D., Perez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Paredes, C.,  
510 2005. Estimation of nutrient values of pig slurries in Southeast Spain using  
511 easily determined properties. *Waste Manage.* 25, 719–725.  
512 Mothè, C., Miranda, I., 2009. Characterization of sugarcane and coconut fibers by  
513 thermal analysis and FTIR. *J Therm Anal Calorim.* 97(2), 661–665.  
514 Nelson, P. N., Baldock, J. A., 2005. Estimating the molecular composition of a diverse  
515 range of natural organic materials from solid-state <sup>13</sup>C NMR and elemental  
516 analyses. *Biogeochemistry.* 72, 1-34.  
517 Nolan, T, Troy, S.M., Healy, M.G., Kwapinski, W., Leahy, J.J., Lawlor, P.G., 2011.  
518 Characterization of compost produced from separated pig manure and a variety  
519 of bulking agents at low initial C/N ratios. *Biores. Technol.* 102: 7131-7138.  
520 Otero, M., Calvo, L.F., Estrada, B., García, A.I., Morán, A., 2002. Thermogravimetry as  
521 a technique for establishing the stabilization progress of sludge from wastewater  
522 treatments plants. *Thermochim. Acta* 389, 121-132.  
523 Paredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J. 2000.  
524 Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mil  
525 wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fert. Soils* 32, 222-227.  
526 Pichler, M., Knicker, H., Kogel-Knabner, I., 2000. Changes in the chemical structure of  
527 municipal solid waste during composting as studied by solid-state dipolar  
528 dephasing and PSRE <sup>13</sup>C NMR and solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy.  
529 *Environ. Sci. Technol.* 34, 4034-4038.  
530 Preston, C. M., Trofymow, J. A., Niu, J., Fyfe, C. A., 1998. <sup>13</sup>CPMAS-NMR  
531 spectroscopy and chemical analysis of coarse woody debris in coastal forests of  
532 Vancouver Island. *For. Ecol. Manag.* 111, 51-68.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 533 Preston, C., 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and  
534 prospects Soil Sci. 161, 144-166.
- 535 Provenzano, M., Outmane, A., Hafidi, M., Senesi, N., 2000. Differential scanning  
536 calorimetric analysis of composted materials from different sources. J. Therm.  
537 Anal. Calorim. 61, 607-614.
- 538 Rovira, P., Kurz-Besson, C., Coûteaux, M., Vallejo, V.R., 2008. Changes in litter  
539 properties during decomposition: a study by differential thermogravimetry and  
540 scanning calorimetry. Soil Biol. Biochem. 40,172-185.
- 541 Smidt, E., Eckhardt, K., Lechner, P., Schulten, H., Leinweber, P., 2005.  
542 Characterization of different decomposition stages of biowaste using FT-IR  
543 spectroscopy and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. Biodegradation  
544 16, 67–79.
- 545 Smidt, E., Lechner, P., 2005. Study on the degradation and stabilization of organic  
546 matter in waste by means of thermal analyses. Thermochim. Acta 438/1- 2, 22-  
547 28.
- 548 Smith, B., 1999. Infrared Spectral Interpretation, CRC Press: Boca Raton, Florida.
- 549 Solano, M.L., Iriarte, F., Ciria, P., Negro, M.J., 2001. Performance characteristics of  
550 three aeration systems in the composting of sheep manure and straw. J. Agric.  
551 Szanto, G.L., Hamalers, H.V.M, Rulkens, W.H., Veeken, A.H.M., 2007. NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and  
552 CH<sub>4</sub> emissions during passively aerated composting of straw-rich pig manure.  
553 Biores. Technol. 98. 2659-2670.
- 554 Tang, J.C., Maie, N., Tada, Y., Katayama, A., 2006. Characterization of the maturing  
555 process of cattle manure compost. Process Biochem. 41, 380-389.
- 556 Wilson, M. A., 1987. NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil  
557 Chemistry, Pergamon Press: Oxford, U.K.

**Table**

[Click here to download Table: Table 1.doc](#)

Table 1. Evolution of organic matter (OM), total organic carbon (TOC), water-soluble carbon ( $C_w$ ), total nitrogen (TN) and total organic carbon to total nitrogen ratio (TOC/TN) of the piles during composting.

| Composting phase  | Days | OM (%)      | TOC ( $g\ kg^{-1}$ ) | $C_w$ ( $g\ kg^{-1}$ ) | TN ( $g\ kg^{-1}$ ) | TOC/TN      |
|---|------|-------------|----------------------|------------------------|---------------------|-------------|
| <i>Pile 1: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (4:3, v:v)</i> |      |             |                      |                        |                     |             |
| I   | 0    | 79.1 ± 0.8  | 363 ± 3              | 27.5 ± 0.7             | 24.2 ± 0.6          | 18.6 ± 0.6  |
| BT  | 15   | 69.1 ± 1.0  | 355 ± 13             | 21.3 ± 1.3             | 29.7 ± 2.6          | 13.8 ± 1.2  |
| T   | 56   | 62.1 ± 0.8  | 336 ± 13             | 14.9 ± 0.1             | 32.1 ± 4.1          | 10.9 ± 1.3  |
| EB  | 103  | 56.7 ± 0.6  | 311 ± 14             | 7.8 ± 0.2              | 34.0 ± 0.6          | 9.3 ± 0.3   |
| M   | 167  | 57.3 ± 0.6  | 303 ± 10             | 7.0 ± 0.1              | 36.1 ± 0.5          | 8.6 ± 0.3   |
| <i>LSD</i>  |      | <i>2.46</i> | <i>36.7</i>          | <i>1.18</i>            | <i>4.42</i>         | <i>1.83</i> |
| <i>Pile 2: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:4, v:v)</i> |      |             |                      |                        |                     |             |
| I   | 0    | 73.3 ± 0.9  | 357 ± 6              | 24.7 ± 0.3             | 27.0 ± 0.3          | 16.2 ± 0.4  |
| BT  | 15   | 70.9 ± 0.8  | 333 ± 5              | 21.1 ± 2.0             | 25.3 ± 1.5          | 14.6 ± 1.2  |
| T   | 56   | 56.2 ± 1.7  | 308 ± 7              | 18.0 ± 2.0             | 28.4 ± 0.6          | 11.1 ± 0.5  |
| EB  | 103  | 57.3 ± 1.2  | 298 ± 11             | 8.1 ± 1.0              | 33.2 ± 0.7          | 9.1 ± 0.4   |
| M   | 167  | 57.2 ± 1.4  | 292 ± 8              | 7.3 ± 0.8              | 31.5 ± 1.1          | 9.4 ± 0.3   |
| <i>LSD</i>  |      | <i>4.86</i> | <i>44.4</i>          | <i>1.82</i>            | <i>5.23</i>         | <i>2.77</i> |
| <i>Pile 3: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:1, v:v)</i> |      |             |                      |                        |                     |             |
| I   | 0    | 76.6 ± 0.3  | 383 ± 1              | 30.9 ± 0.5             | 21.1 ± 2.8          | 18.2 ± 0.4  |
| BT  | 41   | 69.2 ± 0.6  | 367 ± 14             | 21.7 ± 0.4             | 24.0 ± 0.2          | 15.3 ± 0.3  |
| T   | 76   | 65.4 ± 0.4  | 348 ± 10             | 16.8 ± 0.8             | 29.8 ± 1.0          | 11.7 ± 1.4  |
| EB  | 146  | 60.5 ± 0.2  | 293 ± 7              | 9.3 ± 0.7              | 30.5 ± 0.9          | 9.7 ± 0.7   |
| M   | 187  | 59.7 ± 0.7  | 288 ± 3              | 7.5 ± 0.6              | 28.1 ± 0.7          | 10.3 ± 0.8  |
| <i>LSD</i>  |      | <i>1.69</i> | <i>11.1</i>          | <i>1.01</i>            | <i>3.60</i>         | <i>2.82</i> |

I: initial phase of composting; BT: beginning of the thermophilic phase; T: advanced thermophilic phase; EB: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase.

Values reported as mean ± standard error. LSD: Least significant difference at  $P < 0.05$ .

**Table**

[Click here to download Table: Table 2.doc](#)

Table 2. Temperature at which half of the exothermic mass was lost (T50) and the thermostability index (R1) values calculated for the composting samples.

| Composting phase  | Days | T50 (°C) BWE   | T50 (°C) AWE   | R1 BWE       | R1 AWE       |
|---|------|----------------|----------------|--------------|--------------|
| <i>Pile 1: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (4:3, v:v)</i> |      |                |                |              |              |
| I   | 0    | 395            | 370            | 0.47         | 0.46         |
| BT  | 15   | 450            | 376            | 0.61         | 0.55         |
| T   | 56   | 479            | 462            | 0.61         | 0.59         |
| EB  | 103  | 458            | 427            | 0.79         | 0.75         |
| M   | 154  | 471            | 485            | 0.85         | 0.78         |
| <i>P2: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:4, v:v)</i>     |      |                |                |              |              |
| I   | 0    | 353            | 354            | 0.47         | 0.47         |
| BT  | 15   | 399            | 423            | 0.56         | 0.59         |
| T   | 56   | 497            | 521            | 0.67         | 0.71         |
| EB  | 103  | 469            | 476            | 0.69         | 0.74         |
| M   | 167  | 486            | 506            | 0.72         | 0.76         |
| <i>P3: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:1, v:v)</i>     |      |                |                |              |              |
| I   | 0    | 366            | 354            | 0.45         | 0.42         |
| BT  | 41   | 460            | 394            | 0.58         | 0.54         |
| T   | 76   | 456            | 462            | 0.59         | 0.59         |
| EB  | 146  | 474            | 496            | 0.76         | 0.75         |
| M   | 187  | 511            | 471            | 0.82         | 0.77         |
| ANOVA analysis according to the composting stage                          |      |                |                |              |              |
| I   | 0    | 371a           | 359a           | 0.46a        | 0.45a        |
| BT  | 15   | 436b           | 397ab          | 0.58ab       | 0.56b        |
| T   | 56   | 477b           | 481c           | 0.62ab       | 0.63b        |
| EB  | 103  | 467b           | 466bc          | 0.75c        | 0.75c        |
| M   | 167  | 489b           | 487c           | 0.80c        | 0.77c        |
| <i>F-ANOVA</i>  |      | <i>13.7***</i> | <i>14.5***</i> | <i>27***</i> | <i>41***</i> |

BWE: before water-extraction; AWE: after water-extraction.

I: initial phase of composting; BT: beginning of the thermophilic phase; T: advanced thermophilic phase; EB: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase.

**Table**

[Click here to download Table: Table 3.doc](#)

Table 3. Relative intensity (%) of each C types by integration of solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of composting samples. The chemical shift regions were: A) alkyl (45 to -10 ppm); B) N-alkyl/methoxy (60-45 ppm); C) O-alkyl (95-60 ppm); D) O<sub>2</sub>-alkyl (110-95 ppm); E) aromatic (145-110 ppm); F) O-aromatic (165-145 ppm); G) carbonyl (210-165 ppm).

| Composting phase  | Days | Chemical shift regions |      |      |      |     |     |     | Alkyl /O-Alkyl ratio |
|---|------|------------------------|------|------|------|-----|-----|-----|----------------------|
|   |      | A                      | B    | C    | D    | E   | F   | G   |                      |
| <i>Pile 1: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (4:3, v:v)</i> |      |                        |      |      |      |     |     |     |                      |
| I   | 0    | 13.5                   | 5.9  | 58.5 | 16.4 | 3.7 | 0.9 | 1.1 | 4.3                  |
| BT  | 15   | 17.5                   | 8.2  | 49.3 | 13.4 | 5.3 | 1.8 | 4.5 | 2.8                  |
| T   | 56   | 26.0                   | 12.3 | 43.0 | 8.2  | 4.2 | 2.5 | 3.9 | 1.7                  |
| EB  | 103  | 30.1                   | 10.5 | 41.5 | 6.6  | 4.4 | 1.9 | 5.0 | 1.4                  |
| M   | 154  | 35.5                   | 13.1 | 36.7 | 7.1  | 3.6 | 0.7 | 3.4 | 1.0                  |
| <i>Pile 2: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:4, v:v)</i> |      |                        |      |      |      |     |     |     |                      |
| I   | 0    | 19.4                   | 9.3  | 57.1 | 14.5 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 2.9                  |
| BT  | 15   | 13.6                   | 7.1  | 56.3 | 15.3 | 5.5 | 1.0 | 1.2 | 4.1                  |
| T   | 56   | 18.7                   | 4.7  | 49.1 | 12.8 | 7.4 | 3.2 | 4.1 | 2.6                  |
| EB  | 103  | 26.4                   | 11.4 | 38.4 | 6.8  | 5.7 | 4.5 | 6.8 | 1.5                  |
| M   | 167  | 34.1                   | 12.5 | 37.8 | 6.5  | 3.8 | 1.3 | 4.1 | 1.1                  |
| <i>Pile 3: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:1, v:v)</i> |      |                        |      |      |      |     |     |     |                      |
| I   | 0    | 22.9                   | 7.4  | 50.8 | 12.8 | 2.3 | 1.1 | 2.7 | 2.2                  |
| BT  | 41   | 24.9                   | 9.3  | 48.8 | 10.3 | 0.9 | 2.0 | 3.9 | 2.0                  |
| T   | 76   | 21.0                   | 9.3  | 55.4 | 10.1 | 1.1 | 0.9 | 2.2 | 2.6                  |
| EB  | 146  | 18.4                   | 8.1  | 58.3 | 11.4 | 2.1 | 1.4 | 0.3 | 3.2                  |
| M   | 187  | 21.8                   | 9.0  | 50.0 | 8.8  | 2.6 | 2.6 | 5.2 | 2.3                  |

I: initial phase of composting; BT: beginning of the thermophilic phase; T: advanced thermophilic phase; EB: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase.

**Table**  
[Click here to download Table: Table 4.doc](#)

Table 4. Relative absorbance in % of the sum of all peak heights of the FT-IR spectra of the composting samples.

| Composting phase  | Days | Relative absorbance (%)  |                          |                          |                          |                          |                          |                          | 1050/1384 ratio |
|---|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|
|   |      | 2920<br>cm <sup>-1</sup> | 1730<br>cm <sup>-1</sup> | 1630<br>cm <sup>-1</sup> | 1510<br>cm <sup>-1</sup> | 1450<br>cm <sup>-1</sup> | 1384<br>cm <sup>-1</sup> | 1050<br>cm <sup>-1</sup> |                 |
| <i>Pile 1: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (4:3, v:v)</i> |      |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                 |
| I   | 0    | 19.2                     | 4.2                      | 25.6                     | 0.0                      | 8.4                      | 2.6                      | 40.0                     | 15.4            |
| BT  | 15   | 16.2                     | 1.7                      | 28.3                     | 2.5                      | 8.3                      | 2.8                      | 41.3                     | 14.6            |
| T   | 56   | 12.0                     | 2.0                      | 25.4                     | 2.7                      | 8.3                      | 5.3                      | 38.6                     | 7.3             |
| EB  | 103  | 14.0                     | 2.7                      | 28.8                     | 3.3                      | 5.2                      | 11.2                     | 36.1                     | 3.2             |
| M   | 154  | 16.7                     | 2.5                      | 27.9                     | 2.9                      | 5.3                      | 12.7                     | 35.2                     | 2.8             |
| <i>Pile 2: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:4, v:v)</i> |      |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                 |
| I   | 0    | 21.3                     | 4.7                      | 22.6                     | 0.0                      | 7.5                      | 3.2                      | 40.8                     | 12.7            |
| BT  | 15   | 18.4                     | 2.3                      | 26.3                     | 2.2                      | 8.2                      | 3.4                      | 39.4                     | 11.7            |
| T   | 56   | 16.4                     | 1.7                      | 25.4                     | 3.2                      | 8.6                      | 4.2                      | 40.5                     | 9.7             |
| EB  | 103  | 15.9                     | 2.2                      | 26.4                     | 2.6                      | 5.9                      | 13.4                     | 33.6                     | 2.5             |
| M   | 167  | 14.0                     | 2.2                      | 27.2                     | 2.7                      | 4.8                      | 12.9                     | 36.2                     | 2.8             |
| <i>Pile 3: solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:1, v:v)</i> |      |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                 |
| I   | 0    | 25.7                     | 3.8                      | 20.3                     | 0.0                      | 8.1                      | 2.1                      | 40.1                     | 19.0            |
| BT  | 41   | 18.4                     | 2.9                      | 23.0                     | 1.8                      | 7.4                      | 3.2                      | 43.4                     | 13.6            |
| T   | 76   | 15.5                     | 1.4                      | 23.4                     | 3.1                      | 7.3                      | 3.5                      | 46.0                     | 13.3            |
| EB  | 146  | 15.3                     | 1.8                      | 23.5                     | 3.1                      | 6.3                      | 3.8                      | 46.1                     | 12.2            |
| M   | 187  | 14.6                     | 2.4                      | 24.6                     | 3.1                      | 6.2                      | 5.5                      | 43.7                     | 8.0             |

I: initial phase of composting; BT: beginning of the thermophilic phase; T: advanced thermophilic phase; EB: end of the bio-oxidative phase; M: maturity phase.

Figure  
[Click here to download Figure: Figure 1.doc](#)

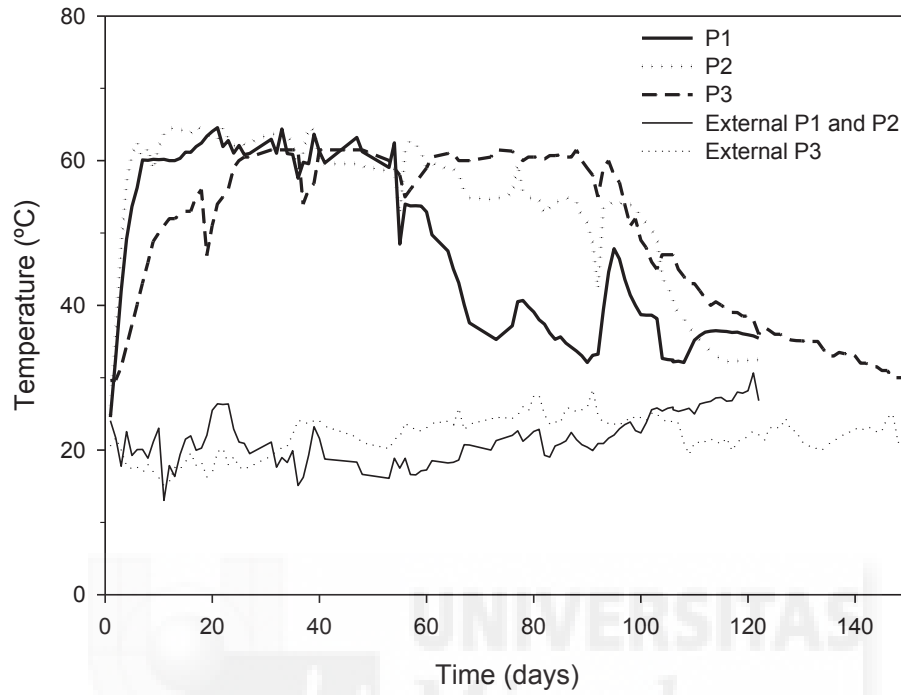


Figure 1.

Figure  
[Click here to download Figure: Figure 2.doc](#)

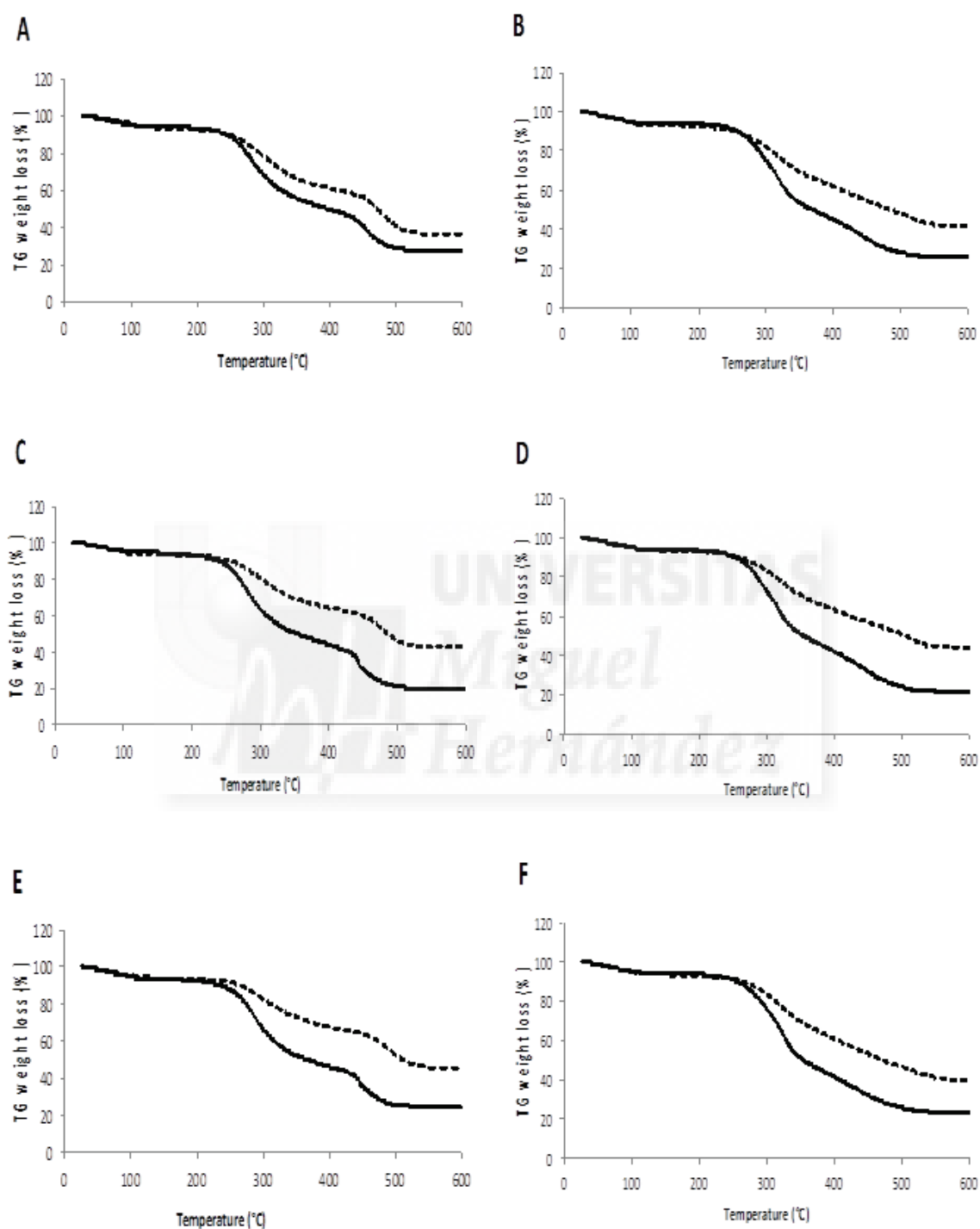


Figure 2.



Figure  
[Click here to download Figure: Figure 3.doc](#)

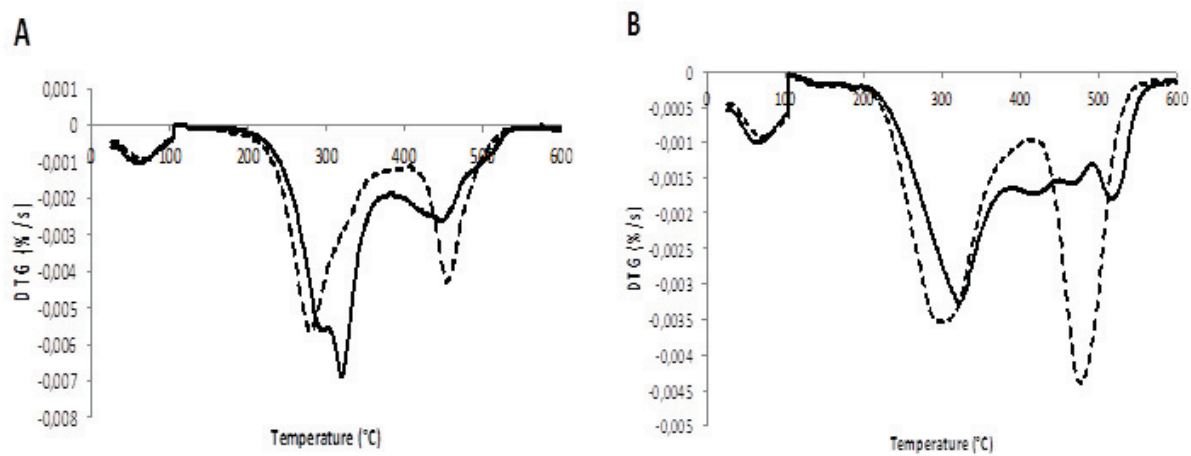


Figure 3.



Figure  
[Click here to download Figure: Figure 4.doc](#)

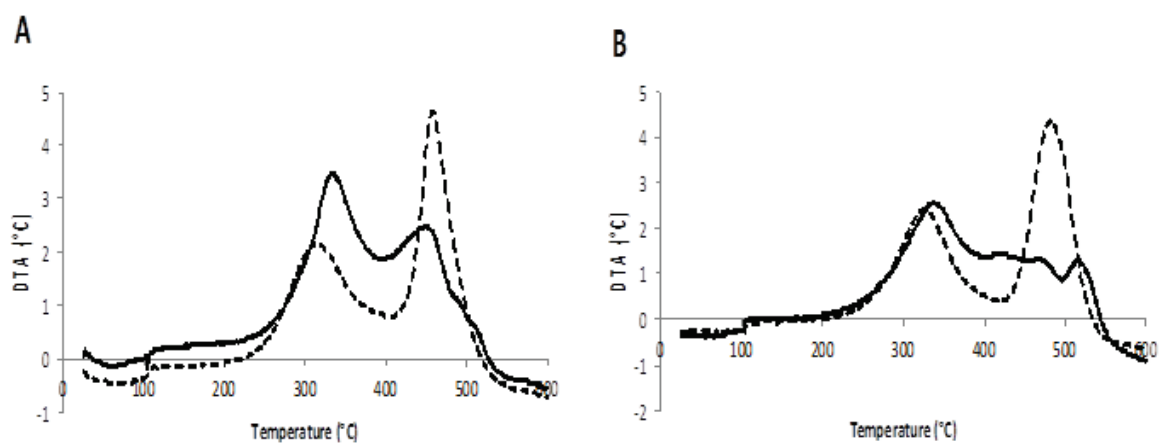


Figure 4.



Figure  
[Click here to download Figure: Figure 5.doc](#)

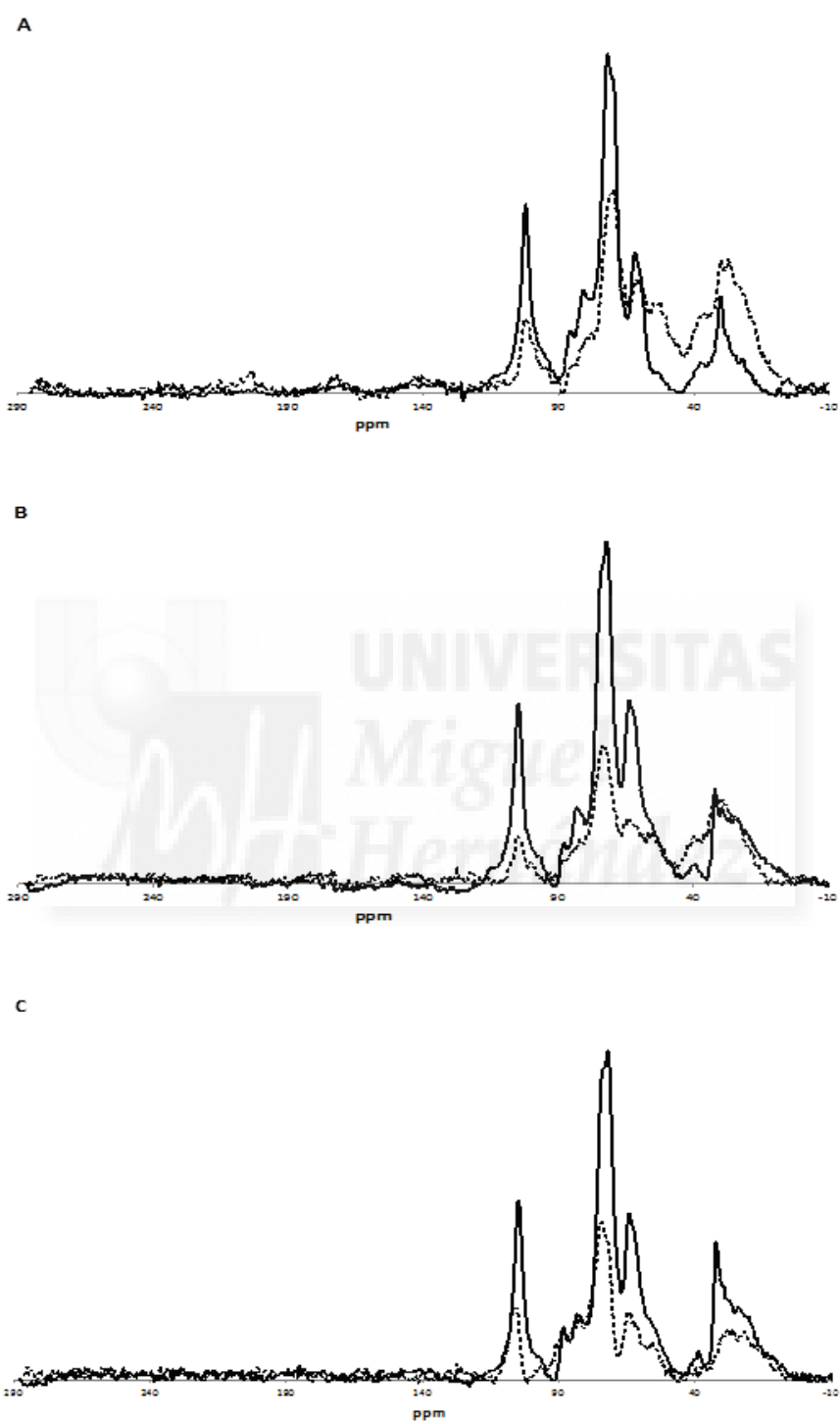


Figure 5.

Figure  
[Click here to download Figure: Figure 6.doc](#)

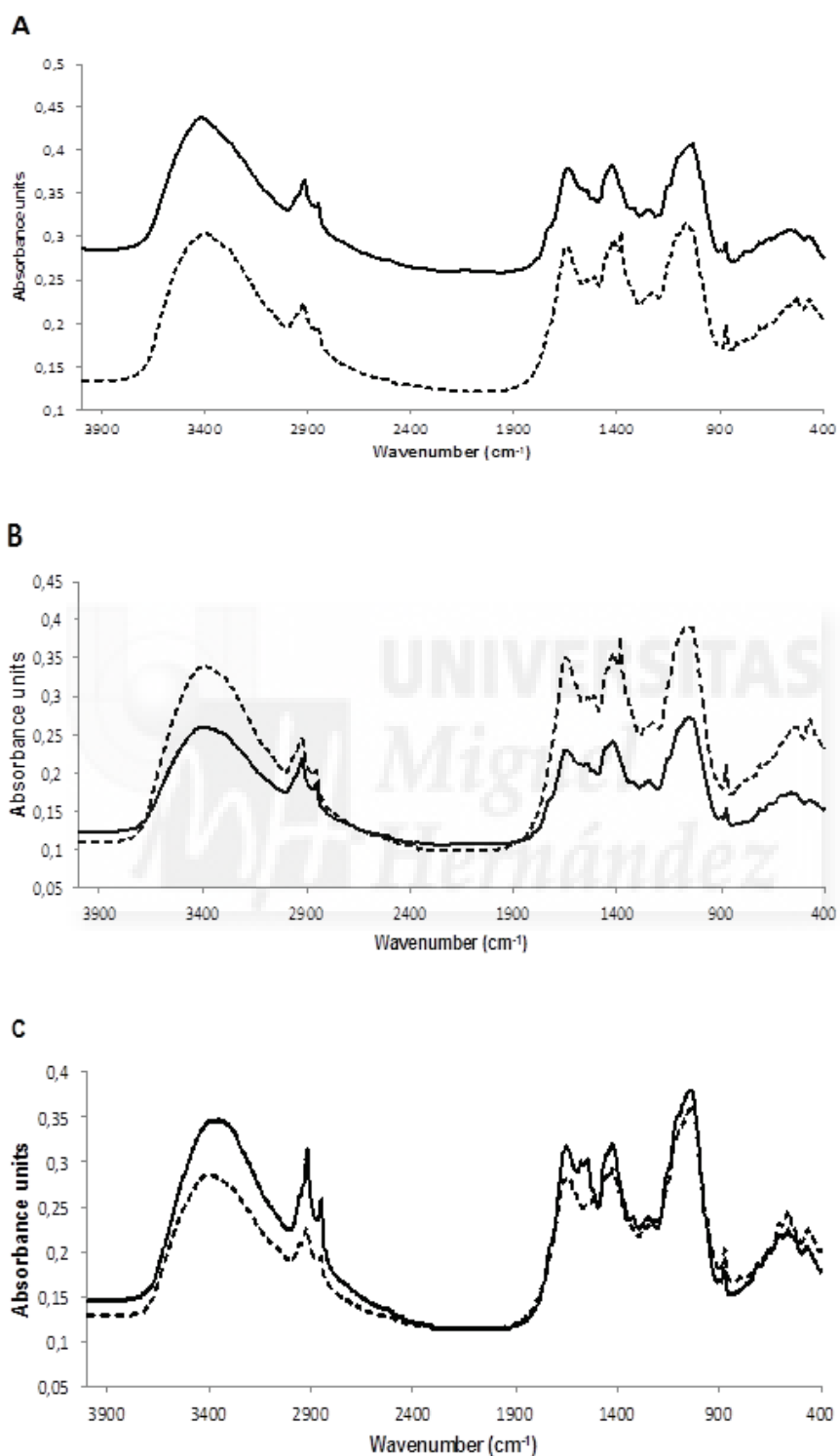


Figure 6.

## Figure

[Click here to download Figure: Figure captions.doc](#)

### Figure captions

**Figure 1.** Temperature profiles during composting of P1 [solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (4:3, v:v)]; P2 [solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:4, v:v)] and P3 [solid fraction of pig slurry + cotton gin waste (3:1, v:v)].

**Figure 2.** Thermogravimetry (TG) curves of the compost samples after the water-extraction (AWE) and before the water-extraction (BWE) process, collected at the beginning (solid line) and end (dotted line) of the composting process. A) Pile 1, samples AWE process; B) Pile 1, samples BWE process; C) Pile 2, samples AWE process; D) Pile 2, samples BWE process; E) Pile 3, samples AWE process; and F) Pile 3, samples BWE process.

**Figure 3.** Derivative thermogravimetry (DTG) curves of the compost samples after the water-extraction (solid line) and before the water-extraction (dotted line) process: A) collected at the beginning and B) at the end of the composting process from Pile 1. See Supplementary Material for the other samples.

**Figure 4.** Differential thermal analysis (DTA) curves of the compost samples after the water-extraction (solid line) and before the water-extraction (dotted line) process: A) collected at the beginning and B) at the end of the composting process from Pile 1. See Supplementary Material for the other samples.

**Figure 5.** Solid-state CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of compost samples collected at the beginning (solid line) and at the end (dotted line) of the composting process. A) Pile 1; B) Pile 2; C) Pile 3.

**Figure 6.** FT-IR spectra of the compost samples collected at the beginning (solid line) and at the end (dotted line) of the composting process. A) Pile 1; B) Pile 2; C) Pile 3.

Supplementary material for on-line publication only

[Click here to download Supplementary material for on-line publication only: Supplementary Materials.doc](#)





**4. Resumen de  
resultados,  
discusiones y  
conclusiones**





**CHARACTERIZATION OF DISSOLVED ORGANIC MATTER FROM SEWAGE SLUDGE USING 3D-FLUORESCENCE SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRIC TOOLS.**

***Caracterización de la materia orgánica soluble procedente de lodos de depuradora utilizando espectroscopia de fluorescencia 3D y herramientas quimiométricas***

Julio Martín-Mata, Frutos C. Marhuenda-Egea, Raúl Moral, Angel Torres-Climent, Encarnación Martínez-Sabater, Concepción Paredes, Xavier Barber y Javier Morales,

***Communications in Soil Science and Plant Analysis, 46 (2015) 188-196***

El **objetivo** de este trabajo es mostrar las posibilidades de las herramientas quimiométricas y del modelo PARAFAC para interpretar los espectros de EEMM-fluorescencia de la materia orgánica soluble (WSOM) de muestras de lodos de depuradoras de distintas procedencias y diferentes tratamientos de estabilización. La variabilidad en la composición de WSOM en distintas muestras de lodos de aguas residuales, podría estar correlacionada con las condiciones de estabilización. La utilización de la espectroscopia de fluorescencia para monitorizar los cambios ocurridos, puede ser una herramienta útil para optimizar la gestión de estos lodos, evitando la contaminación medio ambiental. Sin embargo, la interpretación de los mapas de contorno obtenidos en la espectroscopia EEMM- fluorescencia, con sus múltiples líneas de nivel, puede ser complicada y subjetiva, especialmente para muestras complejas, como ocurre con los lodos de depuradora. Con el modelo PARAFAC, es posible resolver los espectros de emisión excitación de los distintos grupos fluoróforos y determinar su contribución a la fluorescencia total de la muestra. La contribución de cada componente fluoróforo puede determinarse mediante puntuaciones (scores) utilizando otras herramientas estadísticas, que nos proporcione un método de clasificación eficaz, utilizando las condiciones de estabilización de los lodos de depuradora como criterio principal. En este estudio, se han caracterizado por espectroscopia EEMM- fluorescencia un amplio número de muestras de lodos de depuradora (287). La composición molecular

final de las muestras de estos lodos, no estaba condicionada por los tratamientos de estabilización (aeróbicos o anaeróbicos). Sin embargo, se obtuvo una clasificación de lodos de aguas residuales basado en un enfoque espectroscópico- quimiométrico, que podría ser utilizado para la optimización de la utilización de estos lodos en agricultura, minimizando los riesgos medio ambientales.

Las **287 muestras de lodos** se obtuvieron en 80 plantas de tratamiento de aguas residuales del sur de España, durante el periodo 2001- 2007. La población equivalente de la zona es de 500000 habitantes, siendo el de aguas residuales tratados de 200 hm<sup>3</sup>·año<sup>-1</sup>, donde se producían, aproximadamente, 80000 toneladas. Estos residuos se estabilizaron aeróbica y anaeróbicamente, utilizando diferentes tratamientos (61,3 % mediante aireación prolongada, el 29,2 % por fangos activos, el 2,2% por filtros percoladores, el 1,1 % por biocilindros, el 3,3 % por biodiscos y el 2,9 % por formación de compost). Antes de su análisis las muestras se secaron en tierra, se volvieron a secar a 60°C y se almacenaron.

De 4 g de muestra, se realizaron extracciones con 20 ml de agua desionizada agitando durante 24 h a temperatura ambiente, filtrando el extracto y centrifugando 1 ml de muestra a 15000 rpm durante 10 min. Los **espectros de fluorescencia** se obtuvieron con un espectrofluorómetro modelo Jasco FP- 6500, con lámpara de Xenon de 150 W. 100 µl de muestra, se filtraron, centrifugaron y se diluyeron en 2 ml de disolución 20 mM de tampón fosfato de pH 8,0. Los rangos de las longitudes de onda fueron de 220-460 para emisión (Em) y 220-400 para excitación (Ex), con pasos de 8 y 2 nm respectivamente. El espectro UV visible se adquirió mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-160, 200-800 nm, con cubeta de cuarzo de 1 cm, siendo la absorbancia menor a 0,1 a 254 nm, a fin de reducir los posibles efectos de filtros interiores.

Para eliminar los efectos de dispersión Rayleigh y Raman, se utilizó la técnica de escisión- interpolación, antes de aplicar el **método PARAFAC**. También se aplicó una restricción de no negatividad ya que, concentraciones negativas e intensidades de fluorescencia son incompatibles. Para determinar el número de componentes relevantes

para el modelo PARAFAC, se utilizó el método de evaluación CONCORDIA, que proporciona una estimación de lo exacto que resulta el modelo proporcionado por PARAFAC en relación a los datos reales. En este trabajo, el número de componentes más adecuado fue el de cinco, ya que, con un valor de 8,1 explicaba más del 98 % de la variabilidad de los datos de fluorescencia.

La matriz de puntuaciones del modelo PARAFAC se analizó mediante **escalamiento multidimensional (MDS)**. Se utilizaron las funciones Sammon. Antes del análisis multivariante, se calculó el porcentaje de fluorescencia máxima acumulada (cada puntuación dividido por la suma de las puntuaciones de los demás componentes) a fin de eliminar el efecto de concentración y obtener una mejor correlación entre los componentes.

En los espectros EEMM los distintos grupos fluoróforos, se caracterizan por un par de longitudes de onda Ex/Em. Manualmente es complicado identificar cada grupo, ya que, las sustancias húmicas y péptidos que contienen ácidos aromáticos presentes en WSOM de distintas procedencias, dan espectros cualitativamente similares. Al aplicar el **método PARAFAC para cinco componentes**, se obtienen picos espectrales para el primer, cuarto y quinto componente que se pueden asociar a materiales húmicos y fúlvicos. El segundo y tercer componente se asocian ,generalmente, a subproductos de origen microbiano. El segundo componente se asocia con proteínas que contienen restos que contienen triptófano y tirosina. Las puntuaciones (scores) de la primera carga (loading) del modelo PARAFAC, son una estimación de las concentraciones de la WSOM en cada muestra de lodos. No son concentraciones químicas de fluoróforos, pero podrían ser utilizadas en otro análisis quimiométrico, como PCA para lograr una mejor caracterización de la WSOM.

Las **variaciones de composición en los lodos** se visualizaron mediante un mapeo Sammon. Las puntuaciones del modelo PARAFAC se analizaron mediante el método MDS, que permite reducir las distancias entre puntuaciones y visualizar el mapa completo, utilizando las funciones Sammon. La parte negativa del eje X en el mapa

Sammon, estaba dominada por las muestras que habían sido tratadas con aireación prolongada, mientras que la parte positiva de este eje se encontraba dominado por las muestras con tratamiento por fangos activos. Las muestras de compost, se encontraban en la parte positiva del eje Y.

Pensando en el **uso agrícola de los lodos de depuradoras**, podríamos utilizar, a un nivel básico, este enfoque para clasificar la naturaleza química de la WSOM presente. Las muestras de lodos con baja fluorescencia son mejores para su uso agrícola debido a su biodegradabilidad menor y, por tanto, sus efectos duraderos beneficiosos para las propiedades físicas y químicas de suelos enmendados. Estas muestras mostraron fluorescencia menos para las señales de todos los componentes calculados con el modelo PARAFAC (subproductos microbianos, péptidos y sustancias húmicas y fúlvicas), por lo que es razonable pensar que era material más estabilizado y, por tanto, potencialmente menos peligroso para el medio ambiente.

Como **conclusiones** podemos decir que la WSOM de lodos de depuradora muestra una gran variabilidad en cuanto a su generación, viéndose reflejada en los espectros EEM- fluorescencia y en los análisis quimiométricos, encontrándose una correlación significativa entre la WSOM y estabilización aeróbica o anaeróbica. Sin embargo, la combinación de técnicas espectroscópicas y analíticas quimiométricas, permiten clasificar los lodos de depuradoras en diferentes grupos, pudiendo servir como ayuda para la toma de decisiones relacionadas con la gestión de estos residuos, especialmente para maximizar sus propiedades agronómicas y minimizar los riesgos ambientales.

**USE OF THERMAL METHODS AND CHEMOMETRIC TOOLS TO OPTIMIZE THE AGRONOMIC MANAGEMENT OF BIOSOLIDS.**

**Uso de métodos térmicos y herramientas quimiométricas para optimizar la gestión agronómica de lodos de depuradora**

*J. Martín-Mata; A. Torres-Climent; M.P. Gomis; F.C. Marhuenda-Egea, M. A. Bustamante, M.D. Pérez-Murcia, A. Pérez-Espinosa, C. Paredes, R. Moral*

*Journal of Environmental Management* (en revisión).

El **objetivo** de este trabajo ha sido evaluar el uso de métodos térmicos para la caracterización de diferentes muestras de lodos provenientes de aguas residuales y su combinación con herramientas quimiométricas, para caracterizar la materia orgánica presente en estos materiales y proporcionar una información rápida antes de su uso agrícola.

Como **materiales** a estudiar, se utilizaron 94 muestras de aguas residuales provenientes de 80 plantas de tratamiento de estas aguas. Las muestras se se clasificaron según el tipo de planta, población a la que daban servicio, el acondicionamiento y el destino final de los lodos generados. Las muestras fueron estabilizadas mediante distintos tratamientos aeróbicos y anaeróbicos (61,3% por aireación prolongada, 29,2% por fangos activos, 2,2% en filtros percoladores, 1,1% en biocilindros, 3,3% en biodiscos y 2,9% en compostaje), se secaron las muestras a 50° C, se dejaron en tierra y se volvieron a secar a 60° C, almacenándose antes de su análisis.

Respecto al **análisis químico clásico**, se determinaron la materia orgánica total (TOM), carbono orgánico total (COT), nitrógeno Kjeldahl total (TKN), nitrógeno soluble en agua (WSN), C soluble en agua (WSC), C orgánico extraíble (Cex), C como ácido fúlvico (CFA) y C como ácido húmico (Cha). En cuanto a los **análisis térmicos**, las muestras se quemaron con una mezcla de oxígeno/helio (20/80 %), dentro de un rango de

temperaturas de 25 a 800°C. Para el **análisis estadístico** se utilizó el método MDS (Escalamiento Multidimensional) mediante las funciones Sammon. Las variables utilizadas fueron la población equivalente, tipo de tratamiento, método de estabilización utilizado y uso de los biosólidos. Se utilizó el paquete MASS, el análisis de varianza de una vía ANOVA, verificándose la normalidad y la homogeneidad de la varianza mediante las pruebas de Shapiro- Wilk y Levene, respectivamente, antes de ANOVA. Para comparar las diferencias, se utilizó el b-test de Tukey. Este análisis se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS v. 15.0.

En cuanto a los **resultados obtenidos**, para los **análisis químicos**, en relación a la escala de la planta, se encontraron que influía en prácticamente todos los parámetros estudiados, exceptuando Cha. En el estudio de la influencia del tipo estabilización seguido (aeróbico y anaeróbico), se observó que los parámetros TOC, TOM y el contenido en CFA, era mayor en los lodos de depuradora entablizados en condiciones anaeróbicas. En cuanto a la influencia del tipo de tratamiento, se encontraron valores que dependían de esta variable en TKN, Cex, CFA y Cha, siendo los valores más bajos para el tratamiento con biodiscos-biofiltros. También se observó, para todas las muestras de lodos, que los valores de la fracción de ácido fúlvico fueron mayores que las de ácido húmico. En el **análisis térmico**, para TG, los valores de R1 de las muestras se encontraron entre un mínimo de 0,18 y un máximo de 0,85, lo que muestra una gran variabilidad en cuanto a materia orgánica en las muestras. En el estudio de DTA, se observó una gama muy amplia en la composición de la materia orgánica en las muestras. Al relacionar DTA con R1 para tres muestras representativas, para la muestra rica en carbohidratos era de 0,195, para la muestra rica en carbonatos de 0,412 y para la muestra rica en materiales alifáticos de 0,175. Para un R1 alternativo, utilizando el área de la curva de DTA, obteníamos valores de 0,385, 0,403 y 6,936 respectivamente para cada muestra, pudiendo tomarse un valor de R1 superior a 0,6 para reducir el impacto negativo ambiental, utilizando el valor de R1 alternativo para tomar la decisión del destino final de los lodos. Integrando los datos de las curvas DTA, obtenemos la energía liberada en relación a la temperatura, que se relaciona con la disponible para los

microorganismos en el proceso de transformación y estabilización de la materia orgánica, encontrando que para la materia orgánica que quema por debajo de 500°C suponía un 92% del total de la energía para las muestras ricas en carbohidratos, un 83 % para la muestra pobre en materia orgánica y un 29 % para la muestra rica en materiales resistentes. El análisis **quimiométrico** de los valores de TG, DTG y DTA se realizaron aplicando MDS y visualizados utilizando el mapeo de Sammon. La clasificación más clara para las puntuaciones obtenidas, se debió al tipo de tratamiento considerado para los lodos (fangos activos, biodiscos-biofiltros, filtros percoladores u oxidación prolongada), indicando que mediante un análisis térmico, se podría determinar el tratamiento que se ha llevado a cabo en el lodo o poder diseñar las distintas plantas para el mejor tratamiento de los lodos según el destino que se quiera darles.

Como **conclusión** podemos decir que la materia orgánica presente en los lodos muestra una gran variabilidad en relación con su tratamiento, que se puede visualizar en los análisis térmicos, pero la combinación de estos análisis y métodos quimiométricos hacen posible clasificar las muestras de lodos en diferentes grupos, pudiendo ser una ayuda a la hora de tomar decisiones relacionadas con la gestión de lodos, especialmente para optimizar su uso agronómico y minimizar los riesgos ambientales.





**CHEMICAL, THERMAL AND SPECTROSCOPIC METHODS TO ASSESS BIODEGRADATION OF WINERY-DISTILLERY WASTES DURING COMPOSTING**

**Métodos químicos, térmicos y espectroscópicos para estimar la biodegradación de residuos vitivinícolas durante el compostaje**

A. Torres-Climent, P. Gomis, J. Martín-Mata, M.A. Bustamante, F.C. Marhuenda-Egea, M.D. Pérez-Murcia, A., Pérez-Espinosa, C. Paredes, R. Moral

**PLoS ONE 10(9): e0138925. doi:10.1371/journal.pone.0138925**

El **objetivo** de este trabajo fue estudiar el proceso de co-compostaje de residuos de la industria vitivinícola con estiércoles, utilizando los métodos químicos clásicos junto con métodos instrumentales avanzados (análisis térmico, FT-IR y técnicas de CPMAS <sup>13</sup> CNMR) para evaluar el desarrollo del proceso y la calidad de los productos finales obtenidos.

El **diseño experimental** estuvo basado en la elaboración de tres pilas de compostaje (A, B y C) mediante el sistema de compostaje de volteo, utilizando como materiales iniciales residuos de la industria vitivinícola (orujo de bodega (GM) y orujo de desalcoholizado (EGM)) con dos estiércoles animales (estiércol vacuno (CM) y gallinaza (PM)). Las mezclas se prepararon utilizando las siguientes proporciones con respecto a peso seco (respecto a peso fresco entre paréntesis): Pila A: 76% EGM + 24% CM [70:30]; Pila B: 72% GM + 28% CM [70:30]; Pila C: 67% EGM + 33% PM [70:30]. Las mezclas (aprox. 150 kg), fueron depositadas en termo-compostadores de 350 L y dimensiones 70 cm x 70 cm x 85 cm, fabricadas con polietileno y sistema lateral de ventilación natural para asegurar las condiciones aerobias. La humedad de las pilas se controló semanalmente, añadiendo la cantidad de agua necesaria para conseguir mantener una humedad no inferior al 40% y las mezclas fueron volteadas en seis ocasiones, para proporcionar aireación. La fase bio-oxidativa del compostaje se consideró acabada

cuando la temperatura de las pilas fue próxima a la ambiental y no se produjo otro incremento de la misma con los volteos y a partir de entonces, las pilas se dejaron madurar durante dos meses.

Durante el proceso, se realizaron varios muestreos, realizando en las muestras obtenidas **determinaciones analíticas clásicas**, como el pH, la conductividad eléctrica (CE), la materia orgánica (MO) y sus pérdidas, el C orgánico total (TOC) e hidrosoluble (WSC), el N total (TN), las fracciones de C húmico, extraíble y fúlvico, elementos como el P, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn, el índice de germinación y los parámetros de humificación. Adicionalmente, los resultados correspondientes a las pérdidas de materia orgánica se ajustaron a una función cinética mediante el algoritmo de Marquardt-Levenberg, utilizando un modelo de cinética de primer orden para definir la degradación de la materia orgánica durante el compostaje.

Respecto a las **determinaciones instrumentales avanzadas**, se realizaron análisis térmicos, incluyendo análisis de termogravimetría (TG), termogravimetría derivada (DTG) y análisis térmico diferencial (DTA) y análisis espectroscópicos, como la espectroscopia de infrarrojo cercano con transformada de Fourier (FT-IR) y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear en estado sólido (CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR).

En el **análisis térmico**, las muestras fueron quemadas utilizando como condiciones una corriente de oxígeno/He (20/80 %) y un rango de temperatura de 25 a 650°C. Por otra parte, los **espectros de FT-IR** se recogieron en un rango de operación de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizándose la técnica de reflexión total atenuada (ATR), mientras que los análisis de **resonancia magnética nuclear CPMAS  $^{13}\text{C}$**  se realizaron operando a 125,75 MHz para  $^{13}\text{C}$  en siete regiones: carbonilo (210-165 ppm), O aromático (165-145 ppm), aromático (145-110 ppm), O2 alquilo (110-95 ppm) O-alquilo, (95-60 ppm), N-alquil/metoxi (60-45 ppm), y alquilo (45--10 ppm).

Respecto a los **resultados obtenidos**, la evolución de la **temperatura** mostró un lento incremento en todas las mezclas al inicio del proceso, excepto para la pila B

probablemente debido al mayor contenido de compuestos fácilmente degradables en el orujo de bodega (GM). Esta inhibición inicial de la fase termófila durante el compostaje de residuos vitivinícolas pudo deberse al carácter ácido y a la presencia de polifenoles, tal como ya ha sido observado por otros autores (Ranalli et al., 2001; Bustamante et al., 2007, 2013). Sin embargo, el uso de estiércol de vacuno (CM) como ingrediente en la pilas A y B indujo mejores condiciones en la mezcla inicial al reducir algunos de los factores limitantes como el carácter ácido, excepto en la pila C que no se vio dicho efecto positivo.

Los volteos reactivaron el proceso en todas las mezclas y según el índice exotérmico, EXI, la pila B con GM tuvo el comportamiento más exotérmico (1741 °C acumulados), mientras que las pilas A y C con EGM mostraron comportamientos muy similares entre sí (1344 °C y 1317 °C, respectivamente).

Respecto a la **evolución de la materia orgánica**, se observó que el perfil de degradación siguió una ecuación cinética de primer orden:  $OM (\%) = A (1 - e^{-kt})$ , obteniéndose las siguientes ecuaciones, significativas a  $P < 0,001$  (desviación estándar entre paréntesis):

Pila A:  $A = 49,6 (8,1)$ ,  $k = 0,0131 (0,0040)$ ,  $RMS = 0,878$ ,  $F = 65,8 *** 218$ ,  $SEE = 4.89$

Pila B:  $A = 44,2 (6,7)$ ,  $k = 0,0215 (0,0072)$ ,  $RMS = 0,769$ ,  $F = 31,0 *** 219$ ,  $SEE = 6.45$

Pila C:  $A = 50,4 (9,1)$ ,  $k = 0,0091 (0,0030)$ ,  $RMS = 0.880$ ,  $F = 95,8 *** 220$ ,  $SEE = 5,99$

La máxima degradación de la materia orgánica (A) se observó en la pila C con orujo desalcoholizado (EGM), pero la mayor tasa de degradación fue observada en la pila B con orujo de bodega (GM), ya que este pila mostró los valores más altos de k y del producto de (A · k).

La **relación de TOC/TN** disminuyó en todas las pilas, con valores al final del proceso la inferiores a 20, indicando un adecuado grado de madurez. Sin embargo, en la pila C el valor inicial de TOC/TN fue menor que el valor de referencia para el compost maduro, hecho que demuestra la necesidad de usar diferentes parámetros para estimar

la madurez de un compost. El contenido de **C hidrosoluble** disminuyó en todas las pilas debido a la degradación de compuestos hidrosolubles sencillos, mostrando al final del proceso valores cercanos o más bajos del 1,7 %. La relación carbono hidrosoluble frente al nitrógeno total (**WSC/TN**) también disminuyó en un 70%, 62% y 73 % respectivamente para A, B y C, con valores finales dentro del valor límite establecido para un compost maduro.

En cuanto a la evolución del **contenido en ácidos húmicos y fúlvicos** y de los índices de **humificación** no se observó la tendencia clásica de incremento a lo largo del compostaje, mostrándose en general una disminución, pudiendo atribuirse a la co-extracción alcalina y a la co-precipitación ácida parcial de componentes no humificados o no completamente, como los polifenoles, que ocultan la evolución de la fracción húmica, siendo ya descrita esta interferencia en el trabajo de Marhuenda-Egea et al. (2007). Este hecho mostró la alta dependencia de este tipo de parámetros del origen de los materiales iniciales utilizados, no siendo útiles para evaluar la humificación en todos los tipos de composts, destacando la necesidad de usar otras técnicas para evaluar la madurez del compost.

Los resultados del **análisis termogravimétrico (TG)** mostraron un cambio claro en el intervalo de 250 °C a 550 °C, correspondiente a la combustión de los carbohidratos, los compuestos aromáticos y otras sustancias. En las tres pilas se observó que la cantidad de materia quemada en la muestra inicial fue superior que en la muestra de compost maduro a la misma temperatura, indicando este resultado una progresiva transformación de la biomasa en materia humificada.

**En los perfiles DTG**, se observaron tres picos asociados a la degradación de la materia orgánica: dos entre 250 y 400 °C y el tercero entre 450 y 500 °C. Los dos picos dentro de 250-420 °C podrían atribuirse a la combustión de los carbohidratos (celulosa y lignocelulosa) (Ali et al., 2012), componentes principales del material vegetal presente en los residuos vitivinícolas. El primer pico se redujo considerablemente con el tiempo en las pilas B y C; sin embargo, en la pila A sólo se observó un ligero cambio por la mayor

disponibilidad de compuestos fácilmente degradables en B y C. Por otra parte, el contenido en carbohidratos disminuyó durante el compostaje debido a la degradación microbiana, implicando un enriquecimiento en material recalcitrante que se quema entre 450 y 500 °C, debido al efecto de concentración. Todo esto indica que muestras más estabilizadas requieren más energía para su descomposición, es decir, precisan temperaturas más altas para alcanzar las mismas pérdidas de masa, debido a que son más ricas en compuestos aromáticos complejos, mostrando la estabilización de la materia orgánica durante el compostaje.

**Los perfiles de DTA** mostraron dos picos exotérmicos (entre 250-400 °C y entre 400-580 °C), observándose una disminución en la intensidad relativa del primer pico que podía indicar la progresiva degradación de los carbohidratos y de los compuestos alifáticos. Además, se observó un aumento en la intensidad del segundo pico asociado a estructuras aromáticas complejas con altos pesos moleculares.

**Los índices R1 y R2** resumen las transformaciones de la materia orgánica observadas. R1 es la relación entre la pérdida de masa asociada en las dos principales reacciones exotérmicas en TG y R2 es la relación de las áreas de los picos del análisis DTA. En todas las pilas, la relación R1 aumentó durante el compostaje, mostrando la cantidad relativa de la fracción más térmicamente estable con respecto a la menos estable. El comportamiento de R2 fue similar al de R1, pero la diferencia asociada entre muestras iniciales y finales fue mayor que en R1. La evolución de R2 mostró que la materia orgánica más lábil (p.ej. celulosa) que requiere menos energía para su combustión, desapareció durante las primeras etapas del proceso, permaneciendo una materia orgánica más compleja y, por tanto, con mayor estabilidad térmica, debida al efecto concentración y/o por la síntesis de novo de compuestos complejos.

Los resultados de los **espectros FT-IR** no mostraron diferencias en las bandas durante el proceso de compostaje y se utilizó la absorbancia relativa (rA) de 8 bandas (2927, 2854, 1640, 1548, 1428, 1384, 1037, y 875  $\text{cm}^{-1}$ ), aunque sólo la relación entre 1037 y 1384  $\text{cm}^{-1}$ , asignada a la relación C/N mostró cambios con el tiempo y el tipo de

pila. Las pilas B y C mostraron aumentos de esta relación del 17% y el 9% que se correlacionaron negativamente con el aumento observado de la relación de TOC/TN. Además, se observó un aumento en la absorbancia relativa  $rA$  de las señales atribuidas a C alifático (banda a  $2925\text{ cm}^{-1}$ ) que podría explicarse porque son generadas por moléculas vegetales, muy resistentes a la degradación que pueden sufrir un efecto de concentración.

Respecto los resultados del **análisis de espectroscopía CP-MAS 13 C-NMR**, en la pila B se midió un aumento mayor de C alquilo en la región de 0-50 ppm, asociado a la degradación de compuestos alifáticos, posiblemente polisacáridos, en mayor cantidad en la pila B debido al uso de orujo de bodega (GM). Se registraron diferentes señales: a 30 y 33 ppm, correspondiente a grupos metilo y metileno; a 55 ppm, asignada al C $\alpha$  de polipéptidos y/o a grupos O-CH<sub>3</sub> en lignina y en hemicelulosa; una fuerte señal que dominaba los espectros en torno a 72 ppm, asignada a celulosa y hemicelulosa; otra señal a 105 ppm, asignada a diferentes restos de tipo lignina. Aparte, otra región, entre 110 y 170 ppm se puede dividir en dos subregiones: entre 110-140 ppm, asignada a carbonos aromáticos, entre 140-160 ppm, asignada a carbonos aromáticos unidos a O o N de lignina o taninos, con una señal a 142 ppm, asignada a metoxi-sustituido o hidroxisustituido fenilo. El pico a 153 ppm se asignó a C aromático sustituido con oxígeno y entre 170 a 210 ppm, a carbono carbonilo y carboxilo de grupos éster y amida.

Adicionalmente, se calculó el área bajo las curvas, mostrando las regiones O-alquilo (95-60 ppm) y alquilo (45--10 ppm) evoluciones opuestas. Las señales de O-alquilo (de celulosa y hemicelulosa) disminuyeron, especialmente en las pilas A y C y sin embargo, las señales de alquilo (de cadenas alifáticas, tales como lípidos, cutina o suberina) aumentaron en los compost maduros, probablemente debido a la acumulación de estructuras alifáticas de moléculas de cutina y suberina, resistentes a la biodegradación. Este hecho un camino degradativo diferencial de la celulosa y la hemicelulosa, lo cual concuerda con los análisis termogravimétricos.

**Respecto a la calidad de los composts obtenidos**, se obtuvieron valores finales de **pH** cercanos a la neutralidad (6,0 a 8,5) y valores de la **CE** próximos a 2 dS/m, probablemente debido al uso de los estiércoles como ingredientes de las mezclas de compostaje. Las concentraciones de materia orgánica (OM) fueron similares entre los compost y superiores a los valores mínimos establecidos en la legislación española y europea. Los contenidos en **nitrógeno total** TN fueron superiores al 2% y estuvieron afectados por la naturaleza del estiércol. Las concentraciones en otros **macronutrientes**, como P y K, fueron mayores o iguales a los de otros materiales considerados como enmiendas orgánicas, como compost de origen agroindustrial y ganadero. Los contenidos de **Ca** variaron entre 34 y 66 g/kg, y el contenido de Na fue significativamente más bajo que los observados para compost derivados de estiércol. Las concentraciones de **micronutrientes** fueron similares o inferiores a las observadas en los compost de residuos agroindustriales y estiércoles, siendo los valores de **Cu y Zn** inferiores a los valores límite establecidos por la legislación. El contenido en **polifenoles** fue bastante inferior al observado en los materiales iniciales y todos los compost mostraron ausencia de fitotoxicidad, con valores del índice de germinación > 50%.

### Conclusiones

Los métodos analíticos clásicos han mostrado un desarrollo adecuado del proceso de compostaje con un efecto más significativo del tipo de residuo vitivinícola utilizado que del tipo de estiércol, obteniendo en todos los escenarios propuestos productos finales con adecuadas propiedades y un buen grado de madurez para su uso agrícola.

Sin embargo, el enfoque analítico clásico ha demostrado ser ineficaz para estudiar el proceso de humificación de este tipo de materiales. Por tanto, las técnicas de análisis térmico han sido útiles para dilucidar la degradabilidad del material restante y, además, para evaluar cualitativamente la tasa de estabilización de la OM y del C recalcitrante; los análisis de FT-IR ha permitido identificar grupos funcionales en el compostaje que indican estabilidad y madurez; mientras la técnica CPMAS 13 C-NMR ha

proporcionado semi-cuantitativamente el reparto y las estructuras de los compuestos de C durante el proceso, siendo especialmente interesante su variación para evaluar la biotransformación de cada reserva de C, especialmente en la comparación de la reserva de C recalcitrante C vs. la reserva de C lábil, por ejemplo la relación Alquilo/O-alquilo. Por tanto, la combinación de técnicas instrumentales claramente complementan las herramientas analíticas clásicas existentes, especialmente aquellas basadas en determinaciones químicas no específicas. Adicionalmente, el conocimiento de la naturaleza estructural y funcional del compost maduro ayudará a predecir el comportamiento del compost en usos agronómicos.





**ASSESSMENT OF ORGANIC MATTER CHANGES DURING COMPOSTING BY THERMAL ANALYSIS, SOLID-STATE NMR AND FT-IR. WASTE MANAGEMENT**

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA MATERIA ORGÁNICA DURANTE EL COMPOSTAJE MEDIANTE ANÁLISIS TÉRMICO, RMN DE ESTADO SÓLIDO Y FT-IR.**

J. Martín-Mata, C. Lahoz-Ramos, M.A. Bustamante, F.C. Marhuenda-Egea, R. Moral, A. Santos, J.A. Sáez, M.P. Bernal

*Science of the Total Environment* (en revisión).

El **objetivo de este trabajo** ha sido el estudio de los cambios producidos en la materia orgánica durante el proceso de compostaje, mediante técnicas espectroscópicas en pilas formadas por purines y restos de desmotadoras de algodón. La utilización de técnicas termogravimétricas se implementan con los resultados obtenidos por la utilización de CP <sup>13</sup>CRMN para estado sólido y FT-IR, con el fin de aumentar el conocimiento sobre las transformaciones de la materia orgánica presente en las muestras de compost a lo largo del proceso.

En cuanto a los **materiales utilizados**, se prepararon tres pilas (P1, P2 y P3) utilizando la fracción sólida de purines (SFP) y los residuos de desmotadoras de algodón (CW). La fracción sólida se obtuvo mediante una separación sólido- líquido utilizando una prensa de tornillo sin floculantes. Las pilas P1, P2 y P3 se elaboraron en las proporciones SFP: CW : 4:3, 3:4 y 3:1. Las pilas P1 y P2 constaban de 2 toneladas de peso fresco y fueron compostadas mediante el sistema de pila estática Rutgers, con aireación forzada según demanda de temperatura, con una temperatura máxima de 65<sup>0</sup> C, con ventilación forzada bajo demanda a través de control de temperatura. En P1 y P2 la fase biooxidativa duró 103 días y se voltearon dos veces al disminuir la temperatura. P3 se formó utilizando el sistema de volteo con una pila trapezoidal de 19, 2 m<sup>3</sup>. Las

temperaturas termofílicas se dieron durante 70 días, alcanzando valores superiores a 60<sup>0</sup> C. La fase biooxidativa duró 146 días, durante los cuales, la pila se volteó cinco veces. Se consideró que el proceso de compostaje había terminado cuando la temperatura era estable y cercana a la ambiental. Se dejaron madurar dos meses. La humedad se controló semanalmente y se adicionó agua necesaria para mantener la humedad con un grado mayor al 40 %. Las muestras se obtuvieron de siete zonas diferentes de las pilas y se tomaron en el día 0 (muestra inicial-I), dos veces en la fase termófila (comienzo- BT y avanzada- T), al final de la fase biooxidativa (EB) y después del periodo de maduración (M).

En cuanto al **análisis químico clásico**, se determinó el carbono orgánico total (COT), el nitrógeno total (TN), la materia orgánica (MO), el carbono orgánico soluble (C<sub>w</sub>), la fracción húmica (carbono orgánico extraíble C<sub>EX</sub>), carbono de ácido fúlvico (C<sub>FA</sub>) y carbono de ácido húmico (C<sub>HA</sub>), la relación de humificación (HR), el índice de humificación (HI), el porcentaje de carbono de tipo ácido húmico (P<sub>HA</sub>) y el índice de polimerización (P<sub>I</sub>). Todos los parámetros fueron determinados por triplicado.

Los **análisis térmicos** se llevaron a cabo realizando una combustión con una mezcla de Oxígeno/ Helio (20/80 %) en un rango de temperaturas de 25 a 650<sup>0</sup> C. La **RMN de CP MAS <sup>13</sup>C** se llevó a cabo operando a 125,75 MHz para <sup>13</sup>C, calculándose la integración de la señal para siete regiones: carbonilo (210-165 ppm), O-aromático (165-145 ppm), aromático (145- 110 ppm), O<sub>2</sub>- alquilo (110-95 ppm), O-alquilo (95-60 ppm), N-alquil/metoxi(60-45 ppm) y alquilo (45-10 ppm). Los espectros **FT-IR** utilizaron un rango de operación de 400- 4000 cm<sup>-1</sup>. El **análisis estadístico** para evaluar las diferencias significativas entre los valores de los parámetros estudiados durante el compostaje se llevó a cabo mediante el test ANOVA y la prueba de LSD (P< 0,05). Para evaluar las diferencias significativas entre los resultados del análisis térmico (T50 y R1) se utilizó el test dos ANOVA y la prueba de Tukey HSD (P<0,05). Para controlar la normalidad y homogeneidad de la varianza se utilizaron los tests de Shapiro- Wilk y de Levene, con anterioridad a ANOVA. Se llevó a cabo el análisis de regresión de Pearson entre R1 y los

parámetros clásicos (OM, TOC, Cw, TN y TOC/TN). Los datos se analizaron mediante el paquete de software estadístico SPSS v. 19.0.

**Durante el proceso de compostaje** todas las pilas mostraron el perfil típico de temperaturas. Para P1 y P2, la fase termofílica fue más larga alcanzando sus temperaturas antes que P3, pudiendo deberse a las diferencias en las fracciones sólidas de los purines. La distinta humedad inicial podría haber influido en la porosidad y aireación de la muestra. La concentración de MO disminuyó por la degradación microbiana de compuestos orgánicos lábiles. En una segunda fase se dio una menor pérdida de MO, que indicaba compuestos más resistentes a la actividad microbiana, polímeros como ligninas, que se mantuvieron en el producto, sugiriendo que el contenido en MO se estabilizó. La TOC y Cw disminuyeron en el proceso, debido a la mineralización de la MO. La TN aumentó en todas las pilas pudiendo deberse al efecto de concentración causado por la reducción de la masa de compost y/o los procesos de N- inmovilización, disminuyendo la relación TOC/TN hasta valores menores a 12, que indican un aceptable grado de madurez. En cuanto a los parámetros que indican las **fracciones de C**, los compost obtenidos a partir de P1 y P3 mostraron mayores valores de  $C_{HA}$  que el de P2, mientras que P1 y P2 mostraron mayores valores de  $C_{FA}$  que P3. Para valores de **índices de humificación** (HR, HI,  $P_{HA}$   $P_I$ ), los valores más elevados se mostraron en los compost de mayor proporción de SFP, P1 y P3, pero sus valores son para todos los compost, superiores a los referidos por diferentes autores, como indicativos de la madurez del compost.

Las **curvas de TG** mostraron el comportamiento típico de la materia orgánica en un compost entre 25 y 600<sup>0</sup> C, mostrando un aumento del porcentaje de la fracción residual inorgánica relacionada al tiempo de compostaje, a la vez que disminuía la MO. El aumento de la fracción inorgánica (compost maduro vs. Muestras iniciales) fue mayor en P1 que en P2 y P3. En las curvas **DTG** se observaron tres regiones, la primera se dio entre los 25 y 105<sup>0</sup> C atribuida a la pérdida de agua, la segunda entre 200 y 430<sup>0</sup> C que se puede corresponder a la combustión de materia orgánica lábil (hidratos de carbono,

lípidos simples y aminoácidos) y una tercera entre 430 y 580 °C que se relaciona con la combustión de materia orgánica más estable (como por ejemplo compuestos aromáticos y polifenoles). Se estudió el efecto catalítico de las sales solubles inorgánicas y se observó que estas no influían en el área del pico obtenido en DTG, ya que se obtenían datos similares tanto para las muestras originales como para las que se había extraído el agua. Con estas áreas se calculó el índice de termoestabilidad **R1**. Este índice aumentó para los tres tipos de pilas, mostrando valores estables en la etapa de maduración. El análisis de ANOVA mostró que no existían diferencias significativas en las muestras termófilas y en la etapa final de la fase de maduración, mostrando también, que no existían diferencias significativas en los valores de R1 antes y después de haber extraído el agua. En cuanto al índice **T50** aumentó para todas las pilas durante el proceso de compostaje. El análisis de regresión de Pearson entre R1 y los parámetros clásicos de análisis (OM, TOC, Cw y TOC/TN), mostraron correlaciones inversas elevadas, indicando que la materia orgánica recalcitrante estaba relacionada con los valores más altos de R1. Los picos endo y exotérmicos mostrados en las curvas **DTA** se asociaron a los mostrados en DTG. El pico endotérmico alrededor de 98°C correspondía al proceso de deshidratación. El pico exotérmico entre 200 y 400°C se vincularon a la degradación térmica de carbohidratos y otras moléculas lábiles, que fue mayor en las muestras iniciales, disminuyendo a lo largo del proceso coincidiendo con la disminución del porcentaje O-alquilo C. La región entre 430 y 580°C se asoció a la combustión de los compuestos más recalcitrantes que confirmaban el aumento del porcentaje de C alquilo.

Los espectros de **CPMAS <sup>13</sup>C NMR** mostraron picos alrededor de la zona de 73 ppm atribuidos a la presencia de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa). La región correspondiente a O-alquilo (95 a 60 ppm) disminuyó a lo largo del proceso de compostaje sugiriendo la degradación de carbohidratos en el proceso. El incremento de los tipos de C en otras regiones del espectro se debía al efecto de concentración. El aumento de la intensidad relativa en la región de C-alquilo (45 a 10 ppm) coincide con el enriquecimiento de las muestras en compuestos recalcitrantes detectado en el análisis térmico. La proporción entre las fracciones de C más estable de la región alquilo y las

fracciones de C lábiles asociadas a la región O-alquilo, disminuyó en las pilas P1 y P2, mostrando un comportamiento errático en la pila P3 que indicaba diferentes patrones de biotransformación. El distinto comportamiento de P3 puede deberse al distinto proceso utilizado en el sistema de compostaje (volteo de la pila). Se observa una menor intensidad en P3 en las señales de las regiones carbonilo (210-165 ppm), O-aromático (165-145 ppm) y aromática (145-110 ppm).

En cuanto a los espectros obtenidos de **FT-IR**, se observó un incremento en la banda de 1384  $\text{cm}^{-1}$  asignado a nitratos, y un decrecimiento en las bandas 2920  $\text{cm}^{-1}$  y 1050  $\text{cm}^{-1}$  asignados a vibraciones C-H alifático y polisacárido respectivamente. Los cambios en la banda de 2920  $\text{cm}^{-1}$  se pueden utilizar como referencia para evaluar la biotransformación de la materia orgánica durante el proceso de compostaje. La relación entre la intensidad de las bandas de polisacáridos (1050  $\text{cm}^{-1}$ ) y de nitratos (1384  $\text{cm}^{-1}$ ) disminuyó para todas las pilas con el tiempo de compostaje, correlacionándose directamente con la relación C:N. El decrecimiento en la P3 fue diferente al mostrado en P1 y P2, probablemente debido a diferencias en la transformación de la materia orgánica, en concordancia con lo observado en los espectros de CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR.

Como **conclusiones** podemos decir que las técnicas termogravimétricas como las clásicas de análisis daban una correlación parecida entre R1 y los parámetros de C. Las técnicas de RMN y FT-IR se mostraron más eficaces para entender la evolución de C en las pilas, especialmente cuando se comparan los C recalcitrantes frente a los C lábiles. FT-IR se mostró más eficaz en el seguimiento de la biotransformación de la materia orgánica que los métodos clásicos de análisis, utilizando los polisacáridos y los nitratos como compuestos “señalizadores”. Estos cambios detectados en la transformación de la materia orgánica en las técnicas instrumentales, pueden ser utilizados para determinar la calidad en compost maduros.





**5. Conclusión  
general y  
perspectivas de  
futuro**





## 5. Conclusión general y perspectivas de futuro

Los flujos residuales que incluyen de forma significativa materia orgánica en su composición son unos de los ejes de las políticas medioambientales en un entorno de cambio climático, económica, circular y economía verde. La economía verde es aquella que respeta el medioambiente e incluso trabaja en su mejora, por ejemplo aquella que apuesta por evitar contaminar donde se cultiva, pesca y come. Por otro lado, la economía circular es la que permite darle a los recursos un nuevo uso, es decir, minimizar los flujos residuales al valorizarlos. Así, la economía circular apuesta entre otros aspectos por elaborar fertilizantes orgánicos mediante compostaje o aprovechar energéticamente restos vegetales. En definitiva, un desarrollo lógico que formaba parte de los principios básicos del desarrollo humano antes de la revolución industrial, ya que la Tierra es un espacio finito.

En este sentido es esencial conocer de forma íntima la naturaleza de los flujos residuales, así como las transformaciones que se producen en los procesos de valorización. En esta tesis hemos propuesto la utilización de nuevas técnicas instrumentales y métodos quimiométricos de tratamiento de datos para poder contribuir a dicho conocimiento, debido a que los métodos tradicionales en algunos casos nos suministran una información incompleta y en todos los escenarios estas nuevas metodologías propuestas aportan aspectos claves a nivel constitucional, y configuracional y de composición al menos semi-cuantitativa que son altamente útiles para optimizar procesos de estabilización aerobia de los residuos orgánicos.

Podemos establecer que la adecuada gestión de flujos residuales orgánicos y especialmente lodos generados en las EDAR, residuos ganaderos y agrícolas hacia su uso agrícola, se ha convertido en una prioridad desde el punto de vista medioambiental pues el aporte de materia orgánica al suelo reduce el uso de fertilizantes de síntesis y desde el punto de vista económico. Por ello el conocimiento en profundidad de la composición de estos residuos para su utilización en determinados procesos, el determinar la madurez y poder clasificarlos según el tratamiento y procedencia de estos residuos nos ayudará a la toma de decisiones para su posible uso y beneficios que aporten. Además la aplicación de técnicas de análisis instrumental junto a las quimiométricas, suponen un ahorro de tiempo y recursos a la hora de

tomar decisiones en cuanto a la gestión de residuos, al poder clasificarlos por su procedencia y tipo de tratamiento.

En esta tesis por publicaciones, hemos podido:

- Clasificar los lodos de depuradoras de distintas procedencias y diferentes tratamientos de estabilización en función de su materia orgánica soluble haciendo uso de la EEMM-fluorescencia y herramientas quimiométricas PARAFAC, así como agrupar dichos residuos en función de la complejidad de su materia orgánica al usar el análisis térmico.
- Profundizar en el estudio de los grupos funcionales claves involucrados en los procesos de mineralización, neoformación y humificación durante el proceso de co-compostaje de una alta variedad de residuos (purines, residuos vegetales de algodón, industria de bodega y destilería, estiércoles) en condiciones homologables a la realidad de la gestión de residuos en el sector agrícola y ganadero) gracias a técnicas del análisis térmico, CPMAS 13 CNMR y espectroscopia FT-IR.

En cuanto a **futuras líneas de investigación y perspectivas de futuro**, se pueden proponer:

- La selección de aquellas técnicas instrumentales/quimiométricas de mayor eficiencia en la estimación y evaluación de parámetros de interés agronómico y medioambiental como la refractancia de la materia orgánica y las biodisponibilidad de las especies fertilizantes, especialmente nitrogenadas, tanto en flujos residuales frescos como en materiales compostados. Esto nos ayudaría a mejorar su gestión y optimizar procesos de valorización.
- La realización de estudios adicionales para discernir el comportamiento de residuos orgánicos de diferente procedencia durante el proceso de compostaje, para poder determinar la madurez de los materiales obtenidos y poder establecer normativas que incluyan metodologías fiables para a nivel de estabilidad no ya química sino biológica y bioquímica. En esta línea se podría utilizar técnicas instrumentales de análisis avanzadas como la termogravimetría en función de los resultados obtenidos en esta tesis.



## 6. Bibliografía



## **6. Bibliografía**

- Abad, M.; Puchades, R. 2002. Compostaje de residuos orgánicos generados en la Hoya de Buñol (Valencia) con fines hortícolas. Ed. Asociación para la promoción Socioeconómica interior Hoya de Buñol, Valencia.
- Adani, F.; Confalonieri, R.; Tambone, F. 2004. Dynamic respiration index as a descriptor of the biological stability of organic wastes. *J. Environ. Qual.* 33: 1866-1876.
- Albrecht R.; Verrecchia, E.; Pfeifer, HR. 2015. The use of solid-phase fluorescence spectroscopy in the characterization of organic matter transformations. *Talanta*, 134: 453–459.
- Ali, M.; Bhatia, A.; Kazmi, A.A.; Ahmed, N. 2012. Characterization of high rate composting of vegetable market waste using Fourier transform-infrared (FT-IR) and thermal studies in three different seasons. *Biodegradation*, 23: 231–242.
- Almendros, G.; Dorado, J.; González-Vila, F. J.; Blanco, M. J.; Lankes, U. 2000. <sup>13</sup>C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 793-804.
- Andersen, C. M.; Bro, R. 2003. Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data. *Journal of Chemometrics*, 17: 200–15.
- Antizar-Ladislao, B.; Lopez-Reala, J.; Becka, A.J. 2006. *Chemosphere* 64: 839-847.
- Arvanitoyannis I.S.; Ladas, D.; Mavromatis, A. 2006. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 475–487.
- B.O.E. (1990). Real Decreto 1310/1990 donde se incluye la Directiva 86/278/CEE relative a la protección del Medio Ambiente. BOE Nº 262, de 1/11/1990.
- B.O.E. (2000). Plan Nacional de Residuos Urbanos 2000-2006. Resolución 13 de enero de 2000, de la Secretaría General de Medio Ambiente. B.O.E. Nº 28, de 2/02/2000.
- B.O.E. (2005). Real Decreto 824/2005, de 8 de Julio, sobre productos fertilizantes y afines. BOE Nº 171, de 19/07/2005.
- B.O.E. (2009). Plan Nacional de Residuos Urbanos 2008-2015. Resolución 20 enero de 2009, de la Secretaría de Estado de Cambio Climático. B.O.E. Nº 2.4.49, de 26/02/2009.
- B.O.E. 2008. Orden APA/863/2008, de 25 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II, III y VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes y afines. B.O.E. Nº 79, de 1/04/2008.
- Baffi, C.; Dell'Abate, M.T.; Nassisi, A.; Silva, S.; Benedetti, A.; Genevini, P.G. 2007. Determination of biological stability in compost: A comparison of methodologies. *Soil Biol. Biochem.*, 39: 1284–1293.
- Bahram, M.; Bro, R.; Stedmon, C.; Afkhami, A.. 2006. Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. *Journal of Chemometrics* 20:99–105.

- Baker, A. 2002. Fluorescence properties of some farm wastes: Implications for water quality monitoring. *Water Research* 36: 189–95.
- Baker, A. 2002. *Water Res.* 36: 189-194.
- Barneto, A.G.; Carmona, J.A.; Martín, J.E.; Blanco, J.D. 2009. Kinetic models based in biomass components for the combustion and pyrolysis of sewage sludge and its compost. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 86: 108–114.
- Bernal, M.P.; Albuquerque, J.A.; Moral, R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.*, 100: 5444–5453.
- Bernal, M.P.; Albuquerque, J.A.; Moral, R. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 100: 5444–5453.
- Bernal, M.P.; Godar, D.M. 2008. Producción y gestión de los residuos orgánicos: situación actual a nivel mundial comunitario y estatal. En: Moreno-Casco, J. y Moral, R. (ed. Cient.). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp.9-41.
- Bernal, M.P.; Navarro, A.F.; Cegarra, J.; Garcia, D. 1996. Carbon and nitrogen transformation during composting of sweet sorghum bagasse. *Biol. Fertil. Soils*, 22: 141-148.
- Bertocini, E.I.; D’Orazio, V.; Senesi, N.; Mattiazzo, M.E. 2005. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381: 1281-1288.
- Bertoncini, E. I.; D’Orazio, V.; Senesi, N.; Mattiazzo, M.E. 2005. Fluorescence analysis of humic and fulvic acids from two Brazilian oxisols as affected by biosolid amendment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381: 1281–88.
- Bianchi, G.; Celeste, G.; Palmiotto, M.; Davoli, E. 2010. Source identification of odours and VOCs from a composting plant by multivariate analysis of trace volatile organic compounds. *Chem. Eng. Trans.*, 23: 279-284.
- Biasioli, F.; Aprea, E.; Gasperi, F.; Mark, T. 2009. Measuring odour emission and biofilter efficiency in composting plants by proton transfer reaction- mass spectrometry. *Water Sci. Technol.*, 59: 1263- 1269.
- Blanco, M.J.; Almendros, G. J. 1994. Maturity assessment of wheat straw composts by thermogravimetric analysis. *Agric. Food Chem.*, 42: 2454-2459.
- Böhm, K.; Smidt, E.; Tintner, J. 2011. Modelled on Nature- Biological Processes in Waste Management. In: Kumar s, editor. *Integrated Waste Management*. Rijeka, Croatia: InTech. P. 153-178.
- Böhm, K.; Smidt, E.; Tintner, J. 2013. Application of Multivariate Data Analyses in Waste Management, *Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences*, MSc. Leandro Freitas (Ed.), ISBN: 978-953-51-0921-1.
- Booksh, K.S.; Kowalsky, B.R. 1994. Theory of analytical Chemistry. *Anal Chem.*, 66: 782-791.
- Brito, L.M.; Moura, O.I.; Coutinho, J.; Smith, S.R. 2012. Simple technologies for on-farm composting of cattle slurry solid fraction. *Waste Manage.*, 32(7):1332-1340.
- Bro, R. 1997. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38: 149–71.

- Bro, R.; Kiers, H. 2003. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *Journal of Chemometrics*, 17: 274–86.
- Burton, C.H.; Turner, C. 2003. Manure management. Treatment strategies for sustainable agricultura, 2nd edition. Silsoe Research Institute, Bedford, UK, pp.451.
- Burton, H.; Turner, C. 2003. Manure management, Treatment Strategies for Sustainable Agriculture (2<sup>o</sup> ed.) Silsoe Research Institute, Lister and Durling Printers, Flitwick, Bedford, UK.
- Bustamante, M.A.; Alburquerque, J.A.; Restrepo, A.P.; de la Fuente, C.; Paredes, C.; Moral, R.; Bernal, M.P. 2012. Co-composting of the solid fraction of anaerobic digestates, to obtain added-value materials in agriculture. *Biomass Bioenerg.*, 43, 26-35.
- Bustamante, M.A.; Moral, R.; Paredes, C.; Pérez-Espinosa, A.; Moreno-Caselles, J.; Pérez-Murcia, M.D. 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.*, 28: 372–380.
- Bustamante, M.A.; Paredes, C.; Marhuenda-Egea, F.C.; Pérez-Espinosa, A.; Bernal, M.P.; Moral, R. 2008. Co-composting distillery wastes with animal manure: carbon and nitrogen transformations and evaluation of compost stability. *Chemosphere*, 72: 551–557.
- Bustamante, M.A.; Paredes, C.; Moral, R.; Moreno-Caselles, J.; Perez-Murcia, M.D.; Perez-Espinosa, A. 2007. Co-composting of distillery and winery wastes with sewage sludge. *Water Sci Technol.*, 56: 187–192.
- Bustamante, M.A.; Suárez-Estrella, F.; Torrecillas, C.; Paredes, C.; Moral, R.; Moreno, J. 2010. Use of chemometrics in the chemical and microbiological characterization of composts from agroindustrial wastes. *Bioresource Technol.*, 101: 4068–4074.
- Campitelli, P.; Ceppi, S. 2008. Chemical, physical and biological compost and vermicompost characterization: A chemometric study. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 90:64-71.
- Campitelli, P.; Ceppi, S. 2008. Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids. *Geoderma*, 144: 325–333.
- Canet, R.; Ribó, M.; Pomares, F.; Albiach, M.R. 2006. Caracterización y potenciales impactos ambientales de las deyecciones ganaderas. *Tierras de Castilla y León. Ganadería*, 131:6-14.
- Castaldi, P.; Alberti, G.; Merilla, R.; Melis, P. 2005. Study of the organic matter evolution during municipal solidwaste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Manage.*, 25: 209–213.
- Chen, W.; Westerhoff, P.; Leenheer, J.A.; Booksh, K. 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Tech.*, 37: 5701–10.
- Chen, Y. N. 2003. Nuclear magnetic resonance, infrared and pyrolysis: application of spectroscopic methodologies to maturity determination of composts. *Compost Sci. Util.*, 11: 152-168.
- Chikae, M.; Ikeda, R.; Kerman, K.; Morita, Y.; Tamiya, E. 2006. Estimation of maturity of compost from food wastes and agro-residues by multiple regression analysis. *Bioresour. Technol.*, 97: 1979-1985.

- Climent, M.D.; Abad, M.; Aragón, P. 1996. El compost de residuos sólidos urbanos (R.S.U.). Sus características y aprovechamiento en agricultura. Ediciones y Promociones LAV , Diputación de Valencia, Universidad Politécnica de Valencia, pp.187.
- Coble, P. G. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51: 325–46.
- Conte, P.; Spaccini, R.; Piccolo, A. 2004. Distribution of a C-13-labelled hydrophobic tracer over humic fractions of different size and composition. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13: 238-243.
- Cook, R.L. 2004. Coupling NMR to NOM. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 1484-1503.
- Costa, F.; García, C.; Hernández, T.; Polo, A. 1991. Residuos Orgánicos Urbanos. Manejo y Utilización. Ed.: CSIC-CEBAS. Murcia.
- Cuadras, C.M. Nuevos Métodos de Análisis Multivariante. CMC Editions. Barcelona 2014.
- Danés,R.; Molina, V.; Prats, I.L.; Álamos, M.; Boixadera, J.; Torres, E. 1996. Manual de gestió dels purins i de la seva reutilització agrícola. Editado por la Generalitat de Catalunya. Barcelona, pp.128.
- Dell'Abate, M.T.; Benedetti, A.; Sequi, P.J. 2000. Thermal methods of organic matter maturation monitoring during a composting process. *Therm Anal Cal.*, 61: 389–396.
- Dell'Abate, M.T.; Canali, S.; Trinchera, A.;Benedetti, A.; Sequi, P. 1998. Thermal analysis in the evaluation of compost stability: a comparison with humification parameters. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 51: 217–224.
- Diener, S.; Andreas, L.; Herrmann, I.; Ecke, H.; Lagerkvist, A. 2010. Accelerated carbonation of steel slags in a Landfill cover construction. *Waste Manage.*, 30: 132-139.
- DOCE. 1991. Directiva del Consejo de Europa 91/676/CEE relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias. DOCE Nº L 375, de 31 de diciembre de 1991. Corrección de errores DOCE Nº L 92, de 16 de abril de 1993.
- EUROSTAT. (Statistical Office of European Communities). 2013. Accesible en: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/themes>
- Fernández, F.J.; Sánchez-Arias, V.; Villaseñor, J.; Rodríguez, L. 2008.Evaluation of carbon degradation during co-composting of exhausted grape marc with different biowastes. *Chemos.*, 73: 670–677.
- Fernández, J.M.; Plaza, C.; Polo, A.; Plante, A.F. 2012. Use of thermal analysis techniques (TG–DSC) for the characterization of diverse organic municipal waste streams to predict biological stability prior to land application. *Waste Manage.*, 32: 158-164.
- Flotats, X.; Solé, F. 2008. Situación actual en el tratamiento de los residuos orgánicos: aspectos científicos, económicos y legislativos. En: Moreno, J., Moral, R. (editores). *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Folgueras, M.B.; Alonso, M; Díaz, R.M. 2013. Influence of sewage sludge treatment on pyrolysis and combustion of dry sludge. *Energy*, 55: 426-435.
- Fray, B.J. 2004. Computational information desing. Tesis de Master. Massachusetss Institute of Technology, Cambridge. Massachusetts.



- Fuentes, M.; Baigorri, R.; González-Gaitano, G.; García-Mina, J.M. 2007. The complementary use of <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, FTIR and size exclusion chromatography to investigate the principal structural changes associated with composting of organic materials with diverse origin. *Organic Geochem.*, 3: 2012–2023.
- Galvez-Sola, L.; Moral, R.; Moreno-Caselles, J.; Perez-Murcia, M.D.; Perez-Espinosa, A.; Bustamante, M.A.; Paredes, C. 2009. Effectiveness of near infrared reflectance spectroscopy in the quick evaluation of nitrogen content in sewage sludge. *Communications in Soil Science and Plant Anal.*, 40:726–35.
- Galvez-Sola, L.; Moral, R.; Perez-Murcia, M.D.; Perez-Espinosa, A.; Bustamante, M.A.; Martínez-Sabater, E.; Paredes, C. 2010. The potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of agroindustrial compost quality. *Sci. Total Environ.*, 408: 14114-1421.
- García, C.; Hernández, T.; Costa, F. 1990. The influence of composting and maturation processes on the heavy-metal extractability from some organic wastes. *Biological Wastes*, 31: 291-301.
- Gil, M.V.; Calvo, L.F.; Blanco, D.; Sánchez, M.E. 2008. Assessing the agronomic and environmental effects of the application of cattle manure compost on soil by multivariate methods. *Bioresour. Tech.*, 99:5763-5772.
- Gómez, X.; Diaz, M. C.; Cooper, M.; Blanco, D.; Morán, A.; Snape, C.E. 2007. Study of biological stabilization processes of cattle and poultry manure by thermogravimetric analysis and C-13 NMR. *Chemosphere*, 68: 1889-1897.
- Griffin, T. S.; G. A. Porter. 2004. Altering soil carbon and nitrogen stocks in intensively tilled two-year rotations. *Biology and Fertility of Soils*, 39: 366–74.
- Grube, M.; Lin, J.G.; Lee, P.H.; Kokorevicha, S. 2006. Evaluation of sewage sludge-based compost by FT-IR spectroscopy. *Geoderma*, 130: 324-333.
- Guan-Hui, Yu; Yi-Hong, Luo. 2010. PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission spectra for rapid assessment of compost maturity. *Bioresource Technology*, 101: 8244-8251.
- Haberhauer, G.; Rafferty, B.; Strebl, F.; Gerzabek, M.H. 1998. Comparison of the composition of forest soil litter derived from three different sites at various decompositional stages using FTIR spectroscopy. *Geoderma*, 83: 331-342.
- Harshman, R.A. 1970. Foundation of PARAFAC procedure: Models and conditions for an “explanatory” multi-modal factor analysis. *UCLA Working Papers in Phonetics*, 167, 84 pp. (University Microfilms, Ann Arbor, No. 10,085)
- Holm-Nielsen, J.B.; Al-Seadi, T.; Oleskowicz-Popiel, P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*, 100:5478-5484.
- Huang, G.F.; Fang, M.; Wu, Q.T.; Zhou, L.X.; Liao, X.D.; Wong, J.W.C. 2001. Co474 composting of pig manure with leaves. *Environ. Technol.*, 22: 1203-1212.
- Huber-Humer, M.; Tintner, J.; Bohm, K.; Lechner, P. 2011. Scrutinizing compost properties and their impact on methane oxidation efficiency. *Waste Manage.*, 31: 871- 883.

- Hudson, N. J.; Baker, A.; Reynolds, D. 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural waste and polluted waters: A review. *River Research and Applications*, 23: 631–49.
- Inbar, Y.; Chen, Y.; Hadar, Y. 1989. Solid state carbon 13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 53: 1695-1701.
- Inbar, Y.; Chen, Y.; Hadar, Y. 1990. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54: 1316-1323.
- Kiers, H.A.L. 1991. Hierarchical relations among three-way methods. *Psychometrica*, 56:449-470.
- Ko, H.J.; Kim, K.Y.; Kim, H.T.; Kim, C.; Kim, C.N.; Umeda, M. 2008. Evaluation of maturity parameters and heavy metal contents in composts made from animal manure. *Waste Management*, 28: 813-820.
- Kruskal, J.B.; Wish, M. 1978. "Multidimensional Scaling". Sage university paper series on quantitative application in the social sciences, 7-11.
- Labrador- Moreno, J. 1996. La material orgánica en los agrosistemas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed: Mundi-Prensa. Madrid.
- Lee, J.A.; Verleysen, M. 2007. Nonlinear Dimensionality Reduction. Information Science and Statistics Springer. ISBN 978-0387393506.
- Leenheer, J. A.; Croué, J.P. 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 37: 18A–26A.
- Li, M.; Xiao, B.; Wang, X.; Liu, J. 2015. Consequences of sludge composition on combustion performance derived from thermogravimetry analysis. *Waste Manage.*, 35: 141-147.
- Li, X.; Xing, M.; Yang, J.; Zhao, L.; Dai, X. 2013. Organic matter humification in vermifiltration process for domestic sewage sludge treatment by excitation–emission matrix fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Hazard. Mater.*, 261:491-499.
- Lin, C.; Wu, E.; Lee, C.N.; Kuo, S.L. 2011. Multivariate Statistical Factor and Cluster Analyses for Selecting Food Waste Optimal Recycling Methods. *Environ. Eng. Sci.*, 28: 349-356.
- Louwerse, D.J.; Smilde, A.K.; Kiers, H.A.L. 1999. Cross-validation of multiway component models. *J. Chemometric*, 13: 491-510.
- Magdziarz, A.; Werle, S. 2014. Analysis of the combustion and pyrolysis of dried sewage sludge by TGA and MS. *Waste Manage.*, 34: 174-179.
- Malley, D.F.; McClure, C.; Buckley, K.; McCaughey, W.P. 2005. Compositional analysis of cattle manure during composting using a field-portable NIR spectrometer. *Comm. In Soil Sci. Plant Anal.*, 36:455-475.
- Marhuenda-Egea, F. C.; Martínez-Sabater, E.; Jordá, J.; Moral, R.; Bustamante, M.A.; Paredes, C.; Pérez-Murcia, M.D. 2007. Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: Evaluation of the process by fluorescence excitation-emission matrix. *Chemosphere*, 68: 301–09.
- Marhuenda-Egea, F.C.; Martínez-Sabater, E.; Jordá, J.; Sánchez-Sánchez, A.; Moral, R.; Bustamante, M.A.; Paredes, C.; Pérez-Murcia, M.D. 2007. Evaluation of the aerobic composting 480 process of winery and distillery residues by thermal methods. *Thermochim. Acta*, 454: 135-143.

- Martínez-Sabater E; Bustamante, M.A; Marhuenda-Egea, F.C.; El-Khattabi, M.; Moral, R.; Lorenzo, E.2009. Study of the evolution of organic matter during composting of winery and distillery residues by classical and chemometric analysis. *J Agric Food Chem.* , 57: 9613–9623.
- Melis, P.; Castaldi, P. 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process. *Thermochimica Acta*, Vol 413 (1-2): 209-214.
- Milinic, J.; Vidal, M.; Lacorte, S.; Rigo, A. 2014. Leaching of heavy metals and alkylphenolic compounds from fresh and dried sewage sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21: 2009-2017.
- Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Perfil Ambiental de España.2014.
- Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Perfil Ambiental de España. 2009.
- Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Perfil Ambiental de España.2010.
- Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. Perfil Ambiental de España. 2012.
- Mobed, J. J.; Hemmingsen,S.L.; Autry, J.L.; McGown, L.B. 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: Total luminescence spectra with absorbance correction.*Environmental Science and Technology*, 30: 3061–65.
- Moldes, AB; Vázquez, M; Domínguez, J.M.; Díaz-Fierros, F.; Barral, M.T. 2007. Evaluation of mesophilic biodegraded grape marc as soil fertilizer. *Appl Biochem Biotech.*, 141: 27–36.
- Mondini, C.; Dell'Abate, M.T.; Leita, L.; Benedetti, A. 2003. An integrated chemical, thermal, and microbiological approach to compost stability evaluation. *J. Environ. Qual.*, 32 (6): 2379-2386.
- Moral, R.; Moreno-Caselles, J.; Pérez-Murcia, M.D.; Pérez-Espinosa, A.; Rufete, B.; Paredes, C. 2005. Characterisation of the organic matter pool in manures. *Bioresour. Technol.*, 96: 153-158.
- Moral, R.; Perez-Murcia, M.D.; Perez-Espinosa, A.; Moreno-Caselles, J.; Paredes, C. 2005. Estimation of nutrient values of pig slurries in Southeast Spain using easily determined properties. *Waste Manage.*, 25: 719–725.
- Moreno Casco, J.; Moral, R. 2008. (Edit. Cient). *Compostaje*. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid.
- Moreno-Santini, V.; Mansilla- Rivera, I.; Garcia-Rodriguez, O.; Rodriguez-Sierra, C.J. 2012. A Pilot Study Determining Hair Arsenic and Lead Levels in Residents of a Community Established on a Former Landfill in Puerto Rico. *B. Environ. Contam. Tox.*: 1-5.
- Nelson, P. N.; Baldock, J. A. 2005. Estimating the molecular composition of a diverse range of natural organic materials from solid-state <sup>13</sup>C NMR and elemental analyses. *Biogeochemistry*, 72: 1-34.
- Nolan, T.; Troy, S.M.; Healy, M.G.; Kwapinski, W.; Leahy, J.J.; Lawlor, P.G. 2011. Characterization of compost produced from separated pig manure and a variety of bulking agents at low initial C/N ratios. *Biores. Technol.*, 102: 7131-7138.
- Norgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J.P.; Munck, L.; Engelsen, S.B. 2000. Interval partial least-squares regression (iPLS): a comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 54: 413-419.

- Ohno, T.; Bro, R. 2006. Dissolved organic matter characterization using multiway spectral decomposition of fluorescence landscapes. *Soil Science Society of America Journal*, 70: 2028–37.
- OIV. The OIV's assessment of the world vitiviniculture situation. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Available: <http://www.oiv.int>.
- Otero, M.; Calvo, L.F.; Estrada, B.; García, A.I.; Morán, A. 2002. Thermogravimetry as a technique for establishing the stabilization progress of sludge from wastewater treatments plants. *Thermochim. Acta*, 389: 121-132.
- Otero, M.; Calvo, L.F.; Estrada, B.; García, A.I.; Morán, A. 2002. Thermogravimetry as a technique for establishing the stabilization progress of sludge from wastewater treatments plants. *Thermochim. Acta*, 389: 121- 132.
- Pablos, M.V.; Fernandez, C; Babin, M.D.; Navas, J.M.; Carbonell, G.; Martini, F. 2009. Use a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1594-1600.
- Painter, A.J.; Duer, M.J. 2002. Double-quantum-filtered nuclear magnetic resonance spectroscopy applied to quadrupolar nuclei in solids. *Journal of Chem. Phys.*, 116: 710-722.
- Paradelo, R.; Moldes, A.B.; Barral, M.T. 2013. Evolution of organic matter during the mesophilic composting of lignocellulosic winery wastes. *J Environ Manage.*, 116: 18–26.
- Paredes, C.; Cegarra, J.; Bernal, M.P.; Roig, A. 2005. *Environ. Int.*, 31: 305-312.
- Paredes, C.; Roig, A.; Bernal, M.P.; Sánchez- Monedero, M.A.; Cegarra, J. 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fert. Soils*, 32: 222-227.
- Parlanti, E.; Wörz, K.; Geoffroy, L.; Lamotte, M. 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*, 31: 1765–81.
- Pérez Murcia, M.D. 1999. Utilización integral de lodos de depuradora en Agricultura. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante
- Pérez, M.D.; Moreno, J. 2008. Capítulo 21. Residuos urbanos. Casos practicos. Ed: Compostaje.
- Peuravuori, J.; Paaso, N.; Pihlaja, K. 1999. Kinetic study of the thermal degradation of lake aquatic humic matter by thermogravimetric analysis. *Thermochim. Acta*, 325: 181-193.
- Pichler, M.; Knicker, H.; Kogel-Knabner, I. 2000. Changes in the chemical structure of municipal solid waste during composting as studied by solid state dipolar dephasing and PSRE 13C NMR and solid-state 15N NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 4034-4038.
- Planquart, P.; Bonin, G.; Prone, A.; Massiani, C. 1999. Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge compost: Application to low metal loadings. *Sci. Total Environ.*, 241: 161-179.
- Plante, A.F.; Fernández, J.M.; Leifeld, J. 2009. Application of thermal analysis techniques in soil science. *Geoderma*, 153: 1-10.

- Pomares, F.; Canet, R. 2001. Cap.I: Residuos orgánicos y papel de los tratamientos para la aplicación de residuos orgánicos al suelo. En Boixadera, J. y Teira, M.R. Aplicación agrícola de residuos orgánicos. Edición de la Universidad de Lleida. España, pp.356.
- Preston, C. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects *Soil Sci.*, 161: 144-166.
- Preston, C. M.; Trofymow, J. A.; Niu, J.; Fyfe, C. A. 1998. <sup>13</sup>CPMAS-NMR spectroscopy and chemical analysis of coarse woody debris in coastal forests of Vancouver Island. *For. Ecol. Manag.*, 111: 51-68.
- Provenzano, M. R.; de Oliveira, S.C.; Santiago Silva, M.R.; Senesi, N. 2001. Assessment of maturity degree of composts from domestic solid wastes by fluorescence and Fouriertransform infrared spectroscopies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5874–79.
- Provenzano, M.; Ouattmane, A.; Hafidi, M.; Senesi, N. 2000. Differential scanning calorimetric analysis of composted materials from different sources. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 61: 607-614.
- Ranalli, G.; Bottura, G.; Taddei, P.; Garavani, M.; Marchetti, R., Sorlini, C. 2001. Composting of solid and sludge residues from agricultural and food industries. Bioindicators of monitoring and compost maturity. *J Environ Sci Health*, 4: 415–436.
- Réveillé, V.; Mansuy, L.; Jardé, E.; Garnier-Sillam, E. 2003. Characterisation of sewage sludge-derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry*, 34: 615-627.
- Roig, N.; Sierra, J.; Marti, E.; Nadal, M.; Schuhmacher, M.; Domingo, J.L., 2012. Long-term amendment of Spanish soil with sewage sludge: effects on soil functioning. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 158: 41-48.
- Ros, M.; Klammer, S.; Knapp, B.; Aichberger, K.; Insam, H. 2006. Long-term effects of compost amendment of soil on functional and structural diversity and microbial activity. *Soil Use Manage.*, 22: 209-218.
- Ros, M.; Pascual, J.A.; García, C.; Hernández, M.T.; Insam, H. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long- term amendment with different compost. *Soil Biol. Biochem.*, 38: 3443-3452.
- Rovira, P.; Kurz-Besson, C.; Coûteaux, M.; Vallejo, V.R. 2008. Changes in litter properties during decomposition: a study by differential thermogravimetry and scanning calorimetry. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 172-185.
- Sammon, J.W. 1969. "A non-linear mapping for data structure analysis". *IEEE Transactions on Computers*, 18: 401-409.
- Seggiani, M.; Puccini, M.; Raggio, G.; Vitolo, S. 2012. Effect of sewage sludge content on gas quality and solid residues produced by cogasification in a updraft gasifier. *Waste Manage.*, 32: 1826-1834.
- Senesi, N.; Miano, T.M.; Provenzano, M.R.; Brunetti, G. 1991. *Soil Sci.*, 152: 259-271.
- Sierra, M. D.; Giovanela, M.; Parlanti, E.; Soriano-Sierra, E.J. 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*, 58: 715–33.

- Smidt, E.; Böhm, K.; Schwanninger, M. 2011. The Application of FT-IR Spectroscopy in Waste Management. In: G.S. N, editor. Fourier Transforms- New Analytical Approaches and FTIR Strategies. RijeKa, Croatia: InTech. P. 405-430.
- Smidt, E.; Bohm, K.; Tintner, J. 2010. Evaluation of old landfills- A thermoanalytical and spectroscopic approach. *J. Environ. Monitor.*, 13: 362-369.
- Smidt, E.; Lechner, P.; Schwanninger, M.; Haberhauer, G.; Gerzabek, M.H. 2002. Characterization of waste organic matter by FT-IR spectroscopy: application in waste science. *Appl. Spectrosc.*, 56: 1170-1175.
- Smidt, E.; Meissl, A.J.; Schwanninger, M.; Lechner, P. 2008. Classification of waste materials using Fourier Transform infrared spectroscopy and soft independent modeling of class analogy. *Waste Manage.*, 28:1699-1710.
- Smidt, E.; Meissl, K.; Tintner, J.; Binner, E. 2008. Influence of Input Materials and composting operation on humidification of organic matter. In: Hao X, editor. *Dyn. Soil Dyn.Plant. Special Issue*, 1: 50-59.
- Smidt, E.; Tintner, J.; Böhm, K.; Binner, E. 2011. Transformation of biogenic waste materials through anaerobic digestion and subsequent composting of the residues- A case study. *Dyn. Soil Dyn. Plant.* , 5:63-69.
- Smidt, E.; Lechner, P. 2005. Study on the degradation and stabilization of organic matter in waste by means of thermal analyses. *Thermochim Acta*, 438/1-2: 22–28.
- Smith, B. 1999. *Infrared Spectral Interpretation*, CRC Press: Boca Raton, Florida.
- Solano, M.L.; Iriarte, F.; Ciria, P.; Negro, M.J. 2001. Performance characteristics of three aeration systems in the composting of sheep manure and straw. *J. Agric.*, 79: 317-329.
- Sorensen, J.T.; Edwards, S.; Noordhuizen. J.; Gunnarsson, S. 2006. Animal production systems in the industrialized world. *Scientific and Technical Review OIE*, 25: 493-503.
- Stedmon, C. A.; Markager, S. 2005. Resolving the variability of dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnology and Oceanography*, 50: 686–97.
- Stevenson, F.J. (Ed.). 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2<sup>nd</sup> Edition, Wiley, New York .
- Sun, W.; Huang, G.H.; Zeng, G.M.; Qin, X.S.; Sun, X.L. 2009. A stepwise-cluster microbial biomass interference model in food waste composting. *Waste Manage.*, 29: 2956-2968.
- Szanto, G.L.; Hamalers, H.V.M.; Rulkens, W.H.; Veeken, A.H.M. 2007. NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> emissions during passively aerated composting of straw-rich pigmanure. *Biores. Technol.*, 98: 2659-2670.
- Tang, J.C.; Maie, N.; Tada, Y.; Katayama, A. 2006. Characterization of the maturing process of cattle manure compost. *Process Biochem.*, 41: 380-389.
- Tintner, J.; Klug, B. 2011. Can vegetation indicate landfill cover features? *Flora*, 206: 559- 566.
- Torrecillas, C.; Martínez-Sabater, E.; Gálvez-Sola, L.; Agulló, E.; Pérez-Espinosa, A.; Morales, J.; Mayoral, A.M.; Moral, R. 2013. Study of the organic fraction in biosolids. *Commun. Soil Sci. Plan.*, 44 (1-4): 492-501.



- Tu, X.M.; Burdick, D.S. 1992. Resolution of trilinear mixtures: Application in spectroscopy, *Statistica Sinica*, 2: 577-593.
- Tuomela, M.; Vikman, M.; Ataca, A.; Itavaara, M. 2000. *Bioresour. Technol.*, 72: 169-183.
- Venna, J.; Kaski, S. 2007. Comparison of visualization methods for an gene expression data sets. *Information Visualization*, 6: 139-154.
- Wang, X.; Chen, T.; Ge, Y.; Jia, Y. 2008. Studies on land application of sewage sludge and its limiting factors. *J. Hazard. Mater.*, 160 (2-3): 554-558.
- Ward, J.L.; Harris, C.; Lewis, J.; Beale, M.H. 2003. Assessment of <sup>2</sup>H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thalia*. *Phytochemistry*, 62 (6): 949-957.
- Wehrens, R. 2011. *Chemometrics with R: Multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences*. Berlin: Springer-Verlag. ISBN: 978-3-642-17841-2.
- Werle, S.; Wilk, R.K. 2010. A review of methods for the thermal utilization of sewage sludge: the Polish perspective. *Renew. Energ.*, 35: 1914-1919.
- Wilson, M. A., 1987. *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*, Pergamon Press: Oxford, U.K.
- Wold, H. 1975. Path models with latent variables: The NIPALS approach. In: Blalock HM (ed.) *Quantitative Sociology*. Seminar Press, New York . 307-357.
- Wu, L.; Ma, L.Q.; Martinez, G.A. 2000. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *J. Environ. Qual*, 29: 424-429.
- Xiao, Y.; Zeng, G.M.; Yang, Z.H.; Ma, Y.H.; Huang, C.; Shi, W.J. 2011. Effects of Continuous Thermophilic Composting (CTC) on Bacterial Community in the Active Composting Process. *Microbial Ecol.*, 62: 599-608.
- Yamashita, Y.; Tanoue, E. 2003. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry*, 82: 255-71.
- Zbytniewski, R.; Buszewski, B. 2005. Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost, part 1: Chemical and spectroscopic properties. *Bioresour. Technol.*, 96: 471-478.
- Zbytniewski, R.; Buszewski, B. 2005. Characterization of natural organic matter derived from sewage compost. *Bioresour. Technol.*, 96: 479-484.
- Zhao, P.; Ge, S.; Yoshikawa, K. 2013. An orthogonal experimental study on solid fuel production from sewage sludge by employing steam explosion. *Appl. Energy*, 112: 1213-1221.