

Aplicació d'oliassa al sòl: aspectes ambientals i agrològics

Jordi Sierra i Llopart

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**DEPARTAMENT DE PRODUCTES NATURALS,
BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA**

UNITAT D'EDAFOLOGIA

**APLICACIÓ D'OLIASSA AL SÒL:
ASPECTES AMBIENTALS I AGROLÒGICS**

**Jordi Sierra i Llopart
Juny 2003**

Programa de doctorat: GÈNESI, ÚS I CONSERVACIÓ DE SÒLS

Bienni 1997-1999

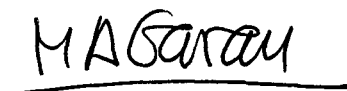
memòria presentada per a optar al títol de Doctor en Farmàcia per:

Jordi Sierra i Llopart

Directors:



Robert Cruañas i Tarradas



M^a Antonia Garau i Guasch

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. PRODUCCIÓ D'OLI D'OLIVA	1
1.1.1. Sistemes d'extracció	5
1.1.1.1. Premsa tradicional de tres fases	6
1.1.1.2. Continu de tres fases	8
1.1.1.3. Continu de dues fases	11
1.1.1.4. Evolució històrica dels residus de la producció de l'oli d'oliva	16
1.1.2. L'oliassa, com a subproductes	17
1.1.2.1. Naturalesa, composició i característiques	18
1.1.2.1.1. Característiques fisico-químiques	18
1.1.2.1.2. Composició química	19
1.1.2.1.3. Càrrega microbiana	27
1.1.2.2. Poder contaminant i toxicitat	28
1.1.2.2.1. Poder contaminant	28
1.1.2.2.2. Toxicitat	31
.....1.1.2.3. Marc legal	34
1.1.4. Mètodes d'eliminació, tractament i valorització	37
1.1.4.1. Sistemes d'eliminació: basses d'evaporació	37
1.1.3.2. Sistemes de tractament	38
1.1.3.2.1. Tractament físic	39
1.1.3.2.2. Tractament químic	41
1.1.3.2.3. Tractament biològic	41
1.1.3.3. Sistemes de valorització	45
1.1.4.3.1. Ús de microorganismes per a l'obtenció de productes d'alt valor afegit	45
1.1.4.3.2. Altres usos	48
1.2. APLICACIÓ D'OLIASSA AL SÒL	49
1.2.1. Abocament massiu	49
1.2.2. Utilització agrològica	50

1.2.3. Efectes	52
1.2.3.1. Efectes sobre les propietats físiques	52
1.2.3.2. Efectes sobre les propietats físico-químiques	52
1.2.3.3. Efectes sobre les propietats químiques	53
1.2.3.4. Efectes sobre les propietats biològiques	55
1.2.3.5. Efectes sobre els vegetals	56
1.3. ORIGEN I DINÀMICA DELS COMPOSTOS FENÒLICS AL SÒL	57
1.3.1. Origen i efectes	57
1.3.2. Dinàmica	59
1.3.2.1. Processos de transformació	59
1.3.2.1.1. Complexació	59
1.3.2.1.2. Reaccions d'hidròlisi	60
1.3.2.1.3. Equilibris àcid-base	60
1.3.2.1.4. Oxidació-reducció	60
1.3.2.1.5. Fotodegradació	62
1.3.2.1.6. Biotransformacions	62
1.3.2.1.7. Polimerització	64
1.3.2.2. Processos de distribució	65
1.3.2.2.1. Precipitació-dissolució	65
1.3.2.2.2. Sorció	66
1.3.2.1.2. Volatilització	68
1.4. ANÀLISI DE COMPOSTOS FENÒLICS EN SÒLS	69
1.4.1. Extracció	69
4.1.1.1. En relació a l'estructura o la distribució	70
4.1.1.2. En relació a la funcionalitat	72
1.4.2. Identificació i quantificació	74
1.4.2.1. Mètodes espectrofotomètrics	75
1.4.2.1.1. Fenols totals	75
1.4.2.1.2. Fenols específics	81
1.4.2.2. Mètodes cromatogràfics	81
1.4.2.2.1. Capa fina i paper	82
1.4.2.2.2. Líquida d'alta resolució (HPLC)	82
1.4.2.2.3. De gasos (GC)	83
1.4.2.2.4. Cromatografia amb detecció per espectrometria de masses	83

1.5. TRACTAMENT DE SÒLS CONTAMINATS PER OLIASSA	
1.5.1. Per via biològica	90
1.5.3.1. Factors que afecten l'estimulació de l'activitat microbiana	94
1.5.3.2. Estudis previs per al sanejament mitjançant l'estimulació de l'activitat microbiana	100
1.5.2. Per rentat	101
1.5.5. Atenuació natural	102
2. OBJECTIUS	105
3. MATERIALS I MÈTODES	109
3.1. MATERIALS	111
3.1.1. Sòls d'abocador d'oliasses	111
3.1.2. Sòls de referència	119
3.1.3. Sòls emprats per a simulacions en columnes lisimètriques.	121
3.1.4. Sòls utilitzats en els estudis de degradació de fenols	122
3.1.5. Sòls utilitzats per a l'estudi de l'aplicació d'oliassa al camp	123
3.1.6. Oliasses	123
3.2. MÈTODES	124
3.2.1. Mètodes de caracterització	124
3.2.1.1. Preparació i conservació de les mostres	124
3.2.1.2. Anàlisi mineralògica	124
3.2.1.3. Propietats físiques	125
3.2.1.4. Propietats fisico-químiques, químiques i biològiques	126
3.2.2. Assajos de simulació en columnes lisimètriques	133
3.2.3. Assajos de respirometria i de biodegradació de fenols	136
3.2.4. Estudi dels efectes de l'aplicació d'oliassa al camp	137
3.2.5. Tractament estadístic	138

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	139
4.1. CARACTERÍSTIQUES DELS SÒLS I LES OLIASSES	141
4.1.1. Caracterització dels sòls utilitzats al laboratori	141
4.1.2. Caracterització de les oliasses emprades	142
4.1.3. Fenols de l'oliassa: polaritat i adsorció al sòl	144
4.1.3.1. Polaritat	144
4.1.3.2. Isotermes d'adsorció	147
4.1.4. Consideracions sobre les característiques de les oliasses	154
4.1. EXTRACCIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN SÒLS	156
4.2.1. Extractants orgànics.	156
4.2.2. Extractants aquosos	157
4.2.2.1. Extracció de fenols en mostres de sòls de referència	158
4.2.2.2. Extracció de fenols d'una mostra de sòl d'un abocador d'oliasses	163
4.2.2.3. Extracció de fenols en sòls contaminats amb oliassa al laboratori	165
4.2.2.4. Comportament dels diversos extractants	168
4.2.2.5. Efecte de diferents variables en l'extracció	171
4.2.3. Consideracions sobre l'extracció de compostos fenòlics en sòls	173
4.3. CARACTERITZACIÓ I EVOLUCIÓ DE LES CARACTERÍSTIQUES DELS SÒLS D'UN ABOCADOR D'OLIASSES	
4.3.1. Estudi dels perfils edafològics	175
4.3.2. Evolució de les característiques dels sòls afectats per l'abocament	190
4.3.3. Consideracions finals sobre l'estudi dels sòls de l'abocador	205

4.4. SIMULACIÓ DE L'APLICACIÓ AGROLÒGICA D'OLIASSA AL SÒL EN COLUMNES LISIMÈTRIQUES	207
4.1.1. Anàlisi dels lixiviats	208
4.1.1.1. Lixiviats del sòl calcari	208
4.1.1.2. Lixiviats del sòl granític	221
4.4.1.3. Comparació entre els lixiviats d'ambdós sòls	234
4.4.1.4. Relació entre els diferents paràmetres analitzats	249
4.4.2. Anàlisi de les mostres de sòl	252
4.4.2.1. Sòl calcari	252
4.4.2.2. Sòl granític	266
4.4.2.3. Comparació d'ambdós sòls	281
4.4.2.4. Relació entre els diferents paràmetres analitzats	298
4.4.3. Conclusions sobre l'experiment de simulació en columnes lisimètriques	303
4.5. ASSAJOS DE RESPIROMETRIA I DE BIODEGRADACIÓ DELS FENOLS DE L'OLIASSA AL SÒL	308
4.5.1. Assajos previs	308
4.5.1.1. assaig amb fenol i glucosa	309
4.5.1.2. experiments amb oliassa	312
4.5.2. Degradació dels fenols de l'oliassa	315
4.5.2.1. Influència de l'activitat biològica	316
4.5.2.2. Evolució de l'activitat biològica i dels compostos fenòlics a curt i mig termini	323
4.5.2.3. Incidència sobre els nitrats del sòl	337
4.5.2.4. Evolució de l'activitat biològica i dels compostos fenòlics en modificar la relació C/N de l'oliassa	339
4.5.2.5. Evolució de l'activitat biològica i dels compostos fenòlics en sòls contaminats de forma massiva amb oliassa	341
4.5.3. Consideracions sobre l'activitat biològica i la degradació de fenols	351

4.6. NIVELLS DE COMPOSTOS FENÒLICS EN SÒLS I EFECTES DE L'APLICACIÓ D'OLIASSA AL CAMP	354
4.6.1. Nivells de compostos fenòlics en sòls de referència	354
4.6.2. Efectes de l'aplicació d'oliassa al camp	360
4.6.3. Consideracions sobre els nivells de fenols i els efectes de l'aplicació d'oliassa al camp	379
4.7. IDENTIFICACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN OLIASSES I SÒLS	381
4.7.1. Cromatografia líquida acoblada a un detector d'ultraviolat Visible (HPLC-UV)	383
4.7.2. Cromatografia líquida acoblada a un detector de masses (HPLC-MS)	398
4.7.3. Cromatografia de gasos acoblada a un detector de masses (CG-MS)	410
4.7.4. Consideracions sobre la identificació dels compostos fenòlics en oliasses i sòls	428
5. CONCLUSIONS	433
6. BIBLIOGRAFIA	439

1. INTRODUCCIÓ

1.1. PRODUCCIÓ D'OLI D'OLIVA

La producció de l'oli d'oliva representa una de les activitats agrícoles més importants de l'àrea mediterrània. L'oli d'oliva al mateix temps és un dels principals ingredients de l'anomenada dieta mediterrània.

L'olivera conreada, *Olea europaea sativa* prové de la varietat silvestre *Olea chrysophylla Lam.* a través de *Olea oleaster L.* o *Olea europaea oleaster*. L'olivera és un arbre o arbust que pertany a la família de les oleàcies, de tronc tortuós i gruixut i de capçada ampla; fulles oposades coriàcies, lanceolades i perennes i flors actinofomes. Les drupes (olives) ovoides i amargues són molt apreciades des de l'antiguitat per la qualitat de l'oli que d'elles s'obté. És característica de la conca mediterrània, i destaca per la seva longevitat, per això es troben arbres mil·lenaris i plantacions centenàries. El cultiu de l'olivera, tot i que pertany a una família distribuïda per totes les regions de la terra excepte les zones polars boreals, la Patagònia i el gran desert Australià (Heywood, 1984), està limitada per la latitud ja que amb prou feines resisteix temperatures inferiors als -12°C . En canvi suporta tot tipus de sòls (especialment els bàsics), de vegades en terrenys poc fèrtils en pendents sotmesos als efectes de l'erosió, zones seques, fins i tot àrides amb precipitacions escasses i amb elevada evapotranspiració, condicions on d'altres cultius són incapaços de produir.

L'extracció i consum de l'oli d'oliva a la zona mediterrània s'ha fet des de fa uns 6.000 anys i van molt lligats a la seva cultura i història (Civantos, 1995).

Actualment es calcula que al món existeixen al voltant de 805 milions d'oliveres, el 98% de les quals es troben a la conca mediterrània, fonamentalment a Espanya (215 milions), Itàlia, Grècia i Tunísia. La producció mundial anual d'olives és d'uns 9,7 milions de tones, de les quals un 94% es destinen a l'obtenció d'oli (Kiritsakii, 1992), amb una producció de quasi dos milions de tones (taula 1.1.1)

Taula 1.1.1. Producció mitjana mundial (Tm any⁻¹) d'olives, oli d'oliva i residus generats en l'obtenció de l'oli durant l'any 1998. (FAOSTAT, 2000)

	Espanya	Unió Europea	Altres països	Producció mundial
Olives	3.450.000	7.700.000	2.000.000	9.700.000
Oli d'oliva	650.000	1.450.000	375.000	1.825.000
Residus	2.600.000	5.800.000	1.500.000	7.300.000

Espanya és el primer país productor d'oli d'oliva amb una producció mitjana anual de 650.000 Tm (hi ha campanyes en les quals es supera el milió de tones), seguit d'Itàlia, Grècia, Tunísia i Turquia; disposa de més de 1.900 molins i 200 plantes d'extracció i, produeix més del 30% de la producció mundial d'oli d'oliva. Per tant, no sorprèn que Espanya sigui el primer exportador mundial (Tous i Romero, 1993).

La producció d'oli d'oliva es distribueix actualment en el territori de l'Estat de la següent manera: Andalusia 80%, Castella la Mancha 7%, Extremadura 5%, Catalunya 3,5% i la resta de l'Estat 4,5% (Tous i Romero, 1993).

A Catalunya el cultiu de l'olivera i la producció de l'oli són considerats de gran importància, tot i que en el conjunt de l'agricultura catalana no representa més del 0,88% de la producció final. Entre els cultius llenyosos, l'olivera ocupa el primer lloc en importància en extensió, a continuació segueix la vinya, l'ametller, l'avellaner i la pomera. L'olivera ocupa una superfície aproximada de 128.000 ha la qual representa el 6,1% de la superfície d'olivera nacional, amb una producció d'olives de 195.000 Tm anuals i una producció de 42.800 Tm d'oli d'oliva i 31.638 Tm d'oli de pinyolassa (DARP, 1999). El conreu de l'olivera es troba a quasi tota la geografia catalana i té força importància en determinades zones de les comarques de Tarragona i Lleida amb 85.000 i 38.000 ha conreades respectivament (figura 1.1.1).

SUPERFÍCIE D'OLIVERA

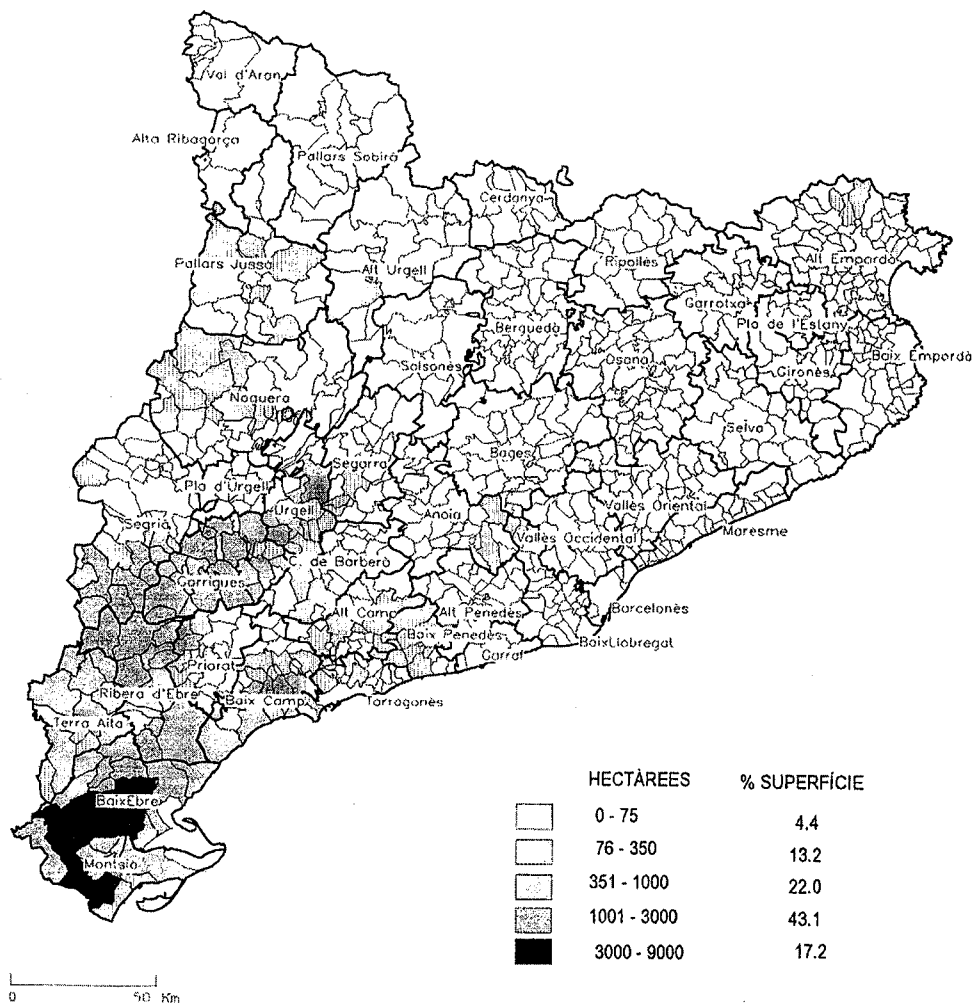


Figura 1.1.1. Superfície del conreu de l'olivera a Catalunya (DARP, 1993).

1.1.1. Sistemes d'extracció

Les instal·lacions industrials on s'extreu l'oli de les olives s'anomenen almàsseres. Aquestes han evolucionat al llarg del temps partint de procediments artesanals i, com la majoria d'indústries, s'han anat adaptant a les exigències actuals dels productes obtinguts, rendiment dels processos i incorporació de noves tecnologies. Amb tot això, no es pot parlar d'una indústria homogènia ja que existeixen i seguiran existint almàsseres artesanals.

L'oli present en les olives (quantitats que oscil·len, per múltiples factors, entre el 15 y el 35%) s'allotja a les cèl·lules del mesocarpi, tancat majoritàriament a els vacúols, i dispers, en menor mesura, en el teixit col·loidal del citoplasma. La condició indispensable per extreure l'oli per procediments exclusivament físics és "alliberar-lo" dels teixits de manera que les minúscules gotes es reunixin en gotes més grans fins arribar a separar-se en una fase líquida contínua.

Durant el procés d'extracció de l'oli d'oliva es distingeixen diferents etapes, que poden influir en la qualitat final de l'oli i en les característiques dels subproductes obtinguts (Martínez Moreno, 1972).

• Operacions preliminars

Un bon oli d'oliva s'obté de l'oliva sana i sencera. Conforme aquesta arriba a l'almàssera ha de ser processada sense esperar, perquè els processos fermentatius comencen aviat i en deterioren la seva qualitat, aportant a l'oli mala olor, gust i elevada acidesa.

Les operacions preliminars de recol·lecció, transport, conservació i rentat de les olives, han de fer-se de forma molt acurada, per evitar que les olives rebin cops i arrossequin terra i impureses que n'alterarien la qualitat de l'oli. S'han d'eliminar dels fruits les impureses que, en conjunt, poden representar entre el 5 i el 10% del pes del fruit en el moment d'entrar a l'almàssera. Aquestes impureses poden ser d'origen vegetal, com fulles i branques; d'origen mineral, com pols, partícules de sòl i pedres; així com restes de contaminants agrícoles com els pesticides.

- **Mòlta i batut**

Aquesta operació té com a objectiu trencar les cèl·lules de la polpa i provocar la sortida de l'oli dels vacúols. Durant l'etapa de mòlta i batut, les olives es transformen en una pasta. En aquest procés els molins efectuen una acció de tall al fruit i conjuntament es produeix una fragmentació de les cèl·lules que alliberen les gotes d'oli. Amb el batut de la pasta s'aconsegueix que les petites gotes es fusionin i formin bosses d'oli que se separen amb facilitat. En finalitzar les operacions de mòlta i batut queda oli lliure, oli retingut en els sòlids pastosos i oli en forma de gotes molt petites fortament emulsionades en la fase aquosa anomenada oliassa (Martínez Moreno, 1972).

- **Extracció**

El mètode d'extracció de l'oli d'oliva influeix de forma relativa en la composició de l'oli resultant, en canvi, té una gran influència en la composició i volum dels subproductes generats. Actualment existeixen tres sistemes d'extracció:

1.1.1.1. Premsa tradicional de tres fases

Aquest procés consisteix en l'aplicació de pressió a una partida de pasta d'oliva prèviament preparada i disposada sobre uns discs filtrants superposats, anomenats cofins. Aquest sistema s'ha estat aplicant des de temps immemorials fins als inicis dels anys vuitanta, encara que naturalment la mecanització del procés ha sofert un desenvolupament espectacular a partir dels anys cinquanta (Rodríguez Prieto, 1995).

Aquest sistema és considerat de tres fases perquè en el procés d'extracció s'obtenen tres productes: l'oli, la pinyolada (subproducte sòlid) i l'oliassa (subproducte líquid).

En aquest sistema, a través del premsat de la massa, se separen els líquids continguts en aquesta, formats per una mescla d'oli i d'oliassa en unes proporcions aproximades del 40% i del 60% respectivament, separant-se ambdues, donat que tenen diferents densitats, per decantació natural (figures 1.1.2 i 1.1.3).

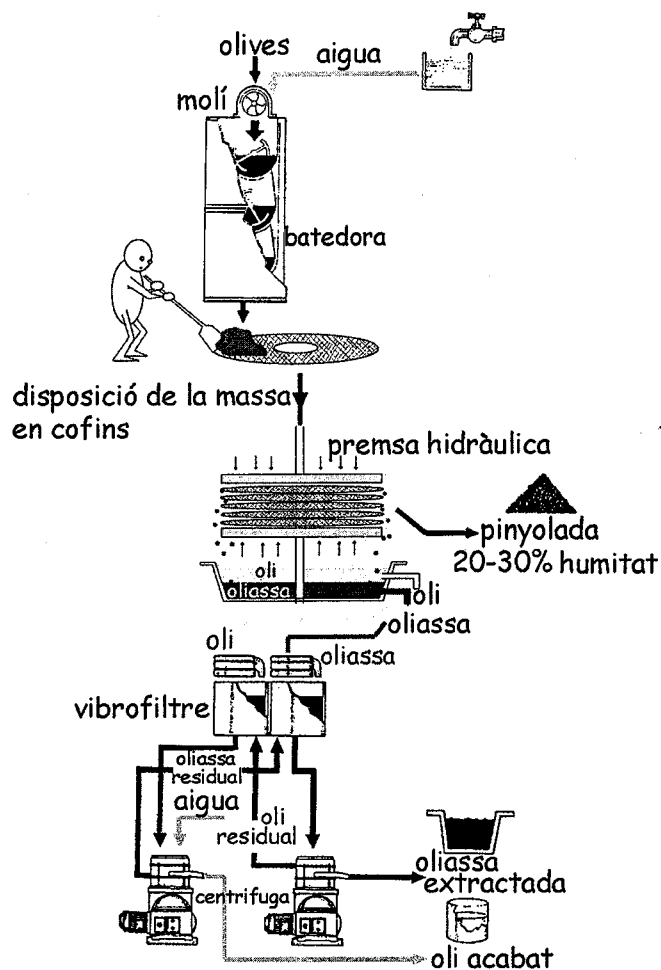


Figura 1.1.2. Esquema del procés d'extracció d'oli d'oliva pel sistema de premsa tradicional de tres fases.

El consum d'aigua en el sistema de premses es redueix a un rentat per arrossegar l'oli que no s'ha escorregut pel seu propi pes, i en una petita addició d'aigua en el procés de mólta, podent-se estimar la totalitat del consum d'aigua en un 10% de la quantitat d'oliva molturada.

Com a subproducte aprofitable (econòmicament parlant) del procés, s'obté la "pinyolada" o "sansa", de baix contingut en humitat, al voltant del 20-30%, i relativament alt contingut en greix, sobre un 6% (del pes humit), equivalent a un 10% respecte el pes sec (taula 1.1.2). Aquest subproducte va originar el desenvolupament d'una indústria complementària a les almàsseres, que aprofita la pinyolada assecant-la i sotmetent-la a una extracció química mitjançant dissolvents, fonamentalment hexà, que extrau l'oli residual (oli de

sansa) contingut a la pinyolada. Aquesta, seca i extractada, és un subproducte aprofitat per les pròpies almàsseres o/i altres indústries de les zones oleïcoles, com combustible de calefacció per als seus processos.

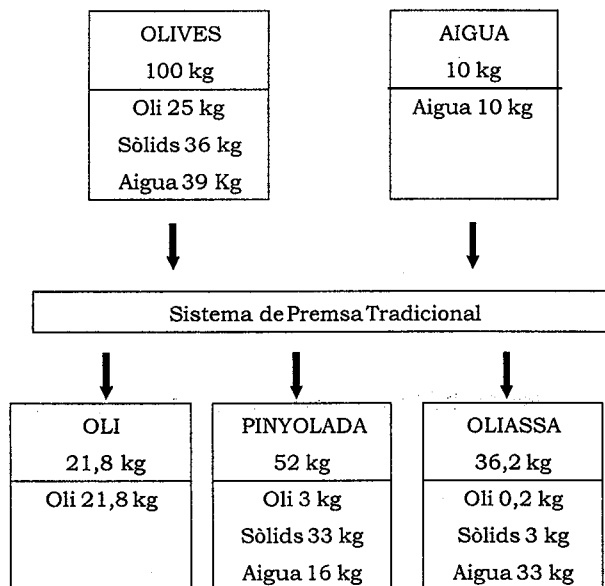


Figura 1.1.3. Balanç de matèria del procés d'extracció d'oli d'oliva pel sistema de premsa tradicional de tres fases.

L'altre subproducte generat en aquest procés és l'**oliassa**, que conté l'aigua de vegetació de les olives, que constitueix del 45 al 50% del pes del fruit, més l'afegida en el procés de mòlta. El volum d'oliassa produït és aproximadament de 0,35 a 0,6 litres per quilogram d'oliva processada (Sequeiros i Sousa, 1994).

1.1.1.2. Continu de tres fases

A finals dels anys seixanta, es començà a introduir un nou procés de fabricació que substituï el sistema de premsat pel centrifugat per tal d'aconseguir la separació de sòlids i líquids.

Aquest nou procés de fabricació substitueix el sistema d'obtenció d'oli discontinu de premses per l'obtenció en continu, eliminant gran part de la mà d'obra necessària per al processat de l'oliva, fet que va afavorir la seva implantació al llarg dels anys vuitanta.

La diferència entre el premsat i la centrifugació consisteix bàsicament en la substitució de la pressió física com a sistema de separació per la centrifugació, gràcies a una centrífuga horitzontal anomenada “decanter” que millora els rendiments i la productivitat de la indústria oleícola. Com a elements diferencials amb el sistema de premses, en les línies contínues s’obté l’oliassa ja separada de l’oli, tot i que aquesta encara conté certa quantitat de greix emulsionat, que cal separar després amb una centrífuga vertical d’oliassa (figura 1.1.4). Aquest procés també es diferencia de l’anterior per la necessitat d’aigua, mentre que en el procés de premses es necessiten uns 100 ml d’aigua per quilogram d’oliva molturada, en el procés continu es fa necessària l’addició de gran quantitat d’aigua (entre 1 i 1,2 litres per quilogram d’oliva molturada) per donar fluïdesa al procés de centrifugació (Rodríguez Prieto, 1995). Això fa que es multipliqui el volum d’oliassa produït en el procés, i al mateix temps, es genera un subproducte sòlid (pinyolada o morca) amb major contingut d’humitat que el generat en el procés de premsat (taula 1.1.2 i figura 1.1.5).

De la centrifugació en tres fases s’obtenen aproximadament 1,3-1,5 litres d’oliassa per quilogram d’oliva molturada, valor elevat si es compara amb els 0,3-0,6 litres que s’obtenen amb el procés de premsat. Òbviament, les característiques d’ambdós subproductes i el seu potencial contaminant són diferents com es veurà més endavant.

L’augment de la humitat de la pinyolada de línies contínues de tres fases respecte la pinyolada de premses existent fins a la introducció del nou procés, va ocasionar un primer impacte a les indústries extractores de l’oli de sansa degut al major cost de transport (es transporta més quantitat d’aigua i menys d’oli) i, sobretot, el major cost de l’operació d’assecat.

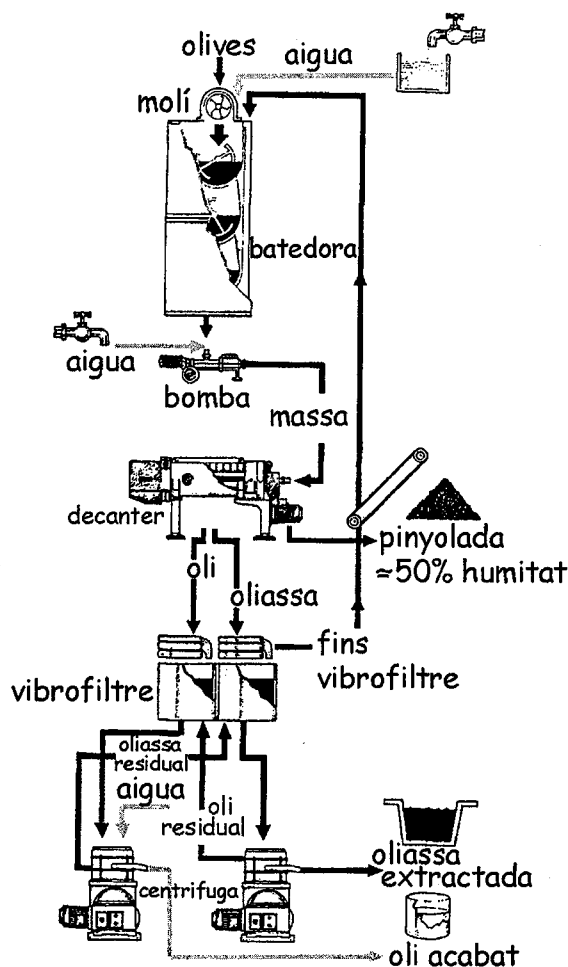


Figura 1.1.4. Esquema del procés d'extracció d'oli d'oliva pel sistema continu de tres fases.

Malgrat aquests inconvenients i després d'un breu període d'adaptació, les instal·lacions d'extracció d'oli de sansa no varen tenir cap problema per a processar el nou subproducte, establint-se però un preu inferior per aquesta pinyolada que per a la de premses, donat els diferents costos d'assecat i el menor rendiment gras.

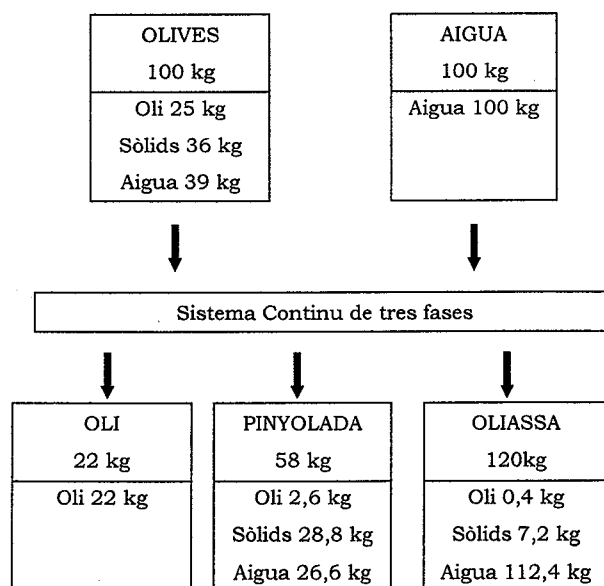


Figura 1.1.5. Balanç de matèria del procés d'extracció d'oli d'oliva pel sistema continu de tres fases.

1.1.1.3. Continu de dues fases

L'any 1992 es va presentar un sistema nou de producció de l'oli d'oliva que ha suposat una revolució tecnològica al sector oleícola. Aquest sistema es diferencia del continu de tres fases en que s'elimina l'aigua com additiu del procés (exceptuant el cas que les olives hagin perdut part de la humitat natural, i per tant cal restablir-la) i els productes de sortida majoritaris són dos: l'oli i la pinyolassa. En aquest cas la pinyolassa inclou en un mateix subproducte la pinyolada i l'aigua de vegetació de l'oliva (figures 1.1.6 i 1.1.7).

L'Agència del Medio Ambiente va impulsar des d'un primer moment el desenvolupament d'aquest sistema ja que suposa uns canvis en el processat de les olives que:

- minimitza la producció d'oliassa.
- estalvia aigua en el procés.
- estalvia energia, ja que no cal escalfar aigua i la quantitat de massa per extractar és inferior.

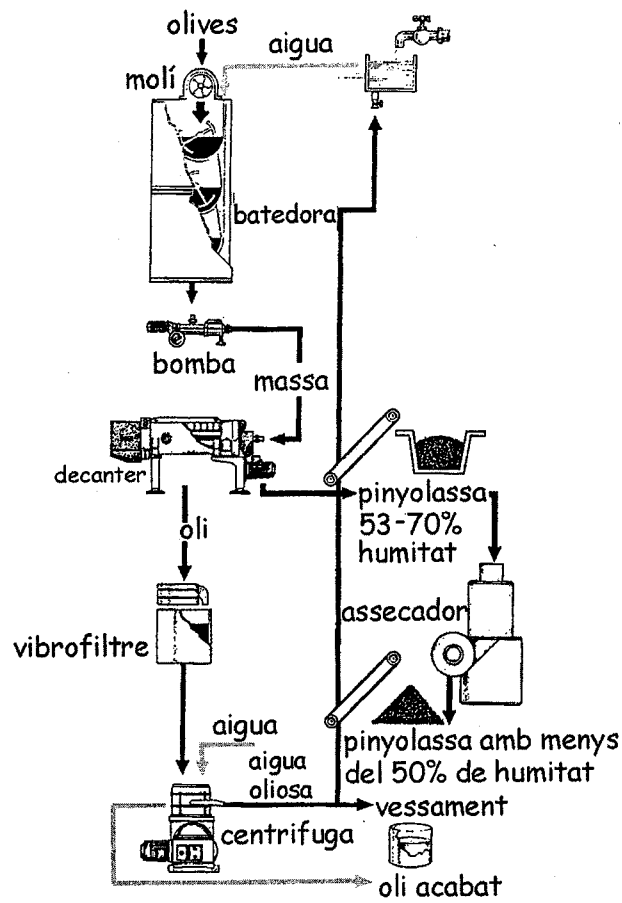


Figura 1.1.6. Esquema del procés d'extracció d'oli d'oliva pel sistema continu de dues fases.

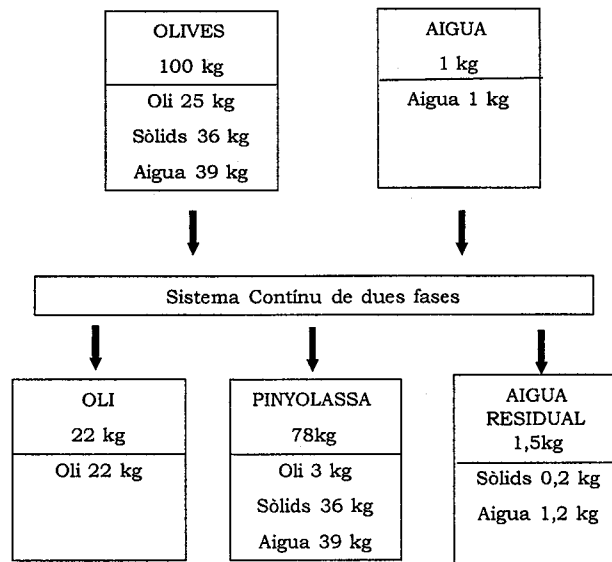


Figura 1.1.7. Balanç de matèria del procés d'extracció d'oli d'oliva pel sistema de continu de dues fases.

En la següent taula es pot apreciar el balanç de matèria generat en els diferents sistemes d'extracció d'oli d'oliva.

Taula 1.1.2. Balanç de matèria generat en cada procés d'extracció de l'oli d'oliva (Hurtado Padilla, 1996; Rodríguez Prieto, 1995).

Sistema d'extracció	Consum d'aigua (L kg⁻¹ d'oliva)	Volum d'oliassa generat (L)	Humitat de la pinyolada (%)	% de greix de la pinyolada sobre pes humit/ pes sec
Prensa tradicional	0,1	0,35-0,6	20-30%	6 / 10
Continu tres fases	1-1,2	1,3-1,4	50%	3-4,5 / 7-8
Continu dues fases	0,1	0,015	57-70%	2,8-3 / 6-7

El sistema de dues fases presenta certs inconvenients. La pinyolassa generada en aquest procés de fabricació presenta característiques substancialment diferents en relació a la pinyolada que es genera pel sistema de tres fases. Aquestes diferències no són únicament degudes a la major humitat del subproducte, que ha augmentat fins a un 60-70%, sinó també a la seva reologia i composició química. El fet de que restin en la pinyolassa elements que en els altres processos eren arrossegats per l'oliassa, ha convertit a l'antiga pinyolada en un subproducte fluid, que presenta alguns inconvenients en els processos d'emmagatzematge, transport, assecat i extracció (Sequeiros i Sousa, 1995; Pina Artal, 1997):

- Al ser més fluid, cal que s'emmagatzemi en basses o tramuges en comptes d'apilar-lo, moure'l amb vis sense fi en comptes de cintes transportadores, i el transport per carretera s'ha de fer amb camions tipus banyera, dificultant el seu maneig.
- En l'assecat, l'increment de temperatura requerit per a aconseguir-ho, donada l'elevada humitat, deteriora la qualitat de l'oli de sansa que s'obté, creant dificultats per al posterior procés de refinat i incrementant els costos.
- Els sucres de l'oliva, que abans eren dissolts per l'oliassa, es queden a la pinyolassa i les altes temperatures dels assecadors els caramelitzen

produint una massa de pinyolassa enganxosa que dificulta l'assecat i, en el procés d'extracció dificulta l'evaporació de l'hexà suposant un cert risc d'incendi.

- En contenir major humitat, l'energia requerida per assecar-la és més gran i en molts casos s'assoleixen temperatures superiors als 600°C (Arjona et al., 1999), que poden afavorir la formació d' hidrocarburs aromàtics policíclics, alguns molt perillosos (com el benzopirè, que és cancerigen) susceptibles de contaminar l'atmosfera i/o l'oli de sànsa.

Aquests problemes, en principi més simples d'abordar tècnicament que els tractaments de depuració de l'oliassa, si no es solucionen poden plantejar una greu situació mediambiental.

Cal tenir en compte que la implantació dels sistemes de dues fases redueix considerablement el volum d'abocaments. Això no s'ha de confondre amb l'abocament zero, ja que continuen produint-se aigües residuals procedents del rentat de les olives, l'esbaldit dels patis, les tramuges i el rentat de l'oli. Segons l'informe de la Direcció General de Protecció Ambiental, sobre la avaluació de la contaminació generada pels sistemes de dos fases, es pot concloure el següent (Sequeiros i Sousa, 1995):

- El volum mig d'aigua residual, generat per les almàsseres que treballen en dues fases, és de 0,3 litres per quilo d'oliva amb una DBO₅ mitja de 20.000 mil·ligrams d'oxigen per litre.
- El 31% de l'afluent abocat correspon a l'aigua del rentat d'olives patis i tramuges, mentre que el 69% prové de les centrífugues de rentat de l'oli.
- Encara que la contaminació global d'una almàssera de dues fases és de l'ordre del 10% de les de tres fases, continua sent un problema important.

Segons alguns estudis (Hurtado Padilla, 1996) el principal desavantatge del procés de dues fases enfront del de tres és que s'obté menor rendiment. La raó tècnica d'aquest desavantatge és que la separació de l'oli en el "decanter" no és total, tant en la fase aquosa com en la pinyolassa queden importants

percentatges d'oli. Per això, sovint en els processos de 3F s'extreu posteriorment l'oli de la fase aquosa (oliassa) mitjançant una centrífuga vertical. En canvi, el procés de 2F, com que no separa la fase aquosa, no pot treure'n oli. Per tant, en els sistemes de 2F cal afinar molt bé les condicions de la pasta (humitat, cabal d'olives, talc, etc.) per obtenir el major rendiment. Aquest fet ha provocat que existeixin iniciatives empresarials diverses que, d'alguna manera, compliquen el panorama del sector de l'oli de sansa. Per exemple, algunes almàsseres estan "repassant" la pinyolassa, donat que aquesta es pot emmagatzemar humida sense que es deteriori, i al final de la campanya la tornen a passar pel "decanter" en unes condicions de temps i temperatura més dràstiques. L'objectiu es acabar de millorar el rendiment en oli a l'almàssera que, al ser considerat verge, té més valor econòmic que l'obtingut mitjançant dissolvents. Això produeix pinyolassa encara amb menys riquesa grassa que per tant té menys atractiu per a les extractores d'oli de sansa. Fins i tot en algunes almàsseres, per tal d'aconseguir una major rendibilitat s'ha instal·lat un sistema mixt, format per un decanter de 2F seguit per un de 3F, que òbviament acaba generant el mateix volum d'oliassa que quan era un sistema únic de 3F.

Amb els sistemes de tres fases, la pinyolada o sansa verge tanca el cicle productiu de l'oli d'oliva. La pinyolada un cop seca, és una matèria primera valuosa per la indústria extractora, que n'obté l'oli de sansa. La sansa esgotada (pinyolada seca extractada), és un subproducte que té propietats combustibles degut al seu alt poder calorífic. Aquest cicle es seguirà tancant fins que l'aprofitament sigui rendible. En el cas dels sistemes d'extracció de dues fases la rendibilitat és qüestionable, fet que ha provocat que comencin a aparèixer abocaments incontrolats de pinyolassa. Es podria arribar a una situació en que les productores d'oli de sansa haguessin de canviar l'objectiu de la seva activitat, passant de ser instal·lacions orientades a l'extracció de l'oli de sansa a convertir-se en instal·lacions de tractament i eliminació de residus.

1.1.1.4. Evolució històrica dels residus de la producció de l'oli d'oliva

El fet de que el sector de la producció de l'oli d'oliva s'hagi anat modernitzant, fa que els residus resultants d'aquesta activitat hagin sofert canvis tant en el volum com en la composició d'aquests (taula 1.1.3 i figura 1.1.8). Així doncs, als anys cinquanta només hi havia molins de premsa tradicional (de 3 fases), al llarg dels anys setanta i vuitanta per necessitats d'economia d'escala, s'ajuntaren petits productors per formar grans cooperatives que invertiren en molins de 3 fases continus, que en consumir més aigua provocaren un increment notable en la producció d'oliassa. Amb l'aparició dels molins de dues fases (campanya 1991-92) s'ha anat implantant aquesta tecnologia, sobretot en molins que ja disposaven de centrífuga, donat que el canvi sembla, des del punt de vista tècnic i econòmic, força viable (Barniol i Comas 1994).

A l'actualitat, o en un futur immediat, el sistema de dos fases serà el sistema que predominarà, un 95% segons dades més optimistes. Les petites almàsseres tradicionals pel cost que suposa el canvi de tecnologia, seguiran produint l'oli d'oliva de forma artesanal mitjançant l'ús de cofins. Per tant, la generació d'oliassa actualment es redueix a la produïda pels molins tradicionals, els de tres fases que encara no s'han adaptat a les dues fases i la que es pugui generar en el "repàs" que efectueïn els molins de dues fases (aquesta darrera opció no està quantificada a la taula 1.1.3).

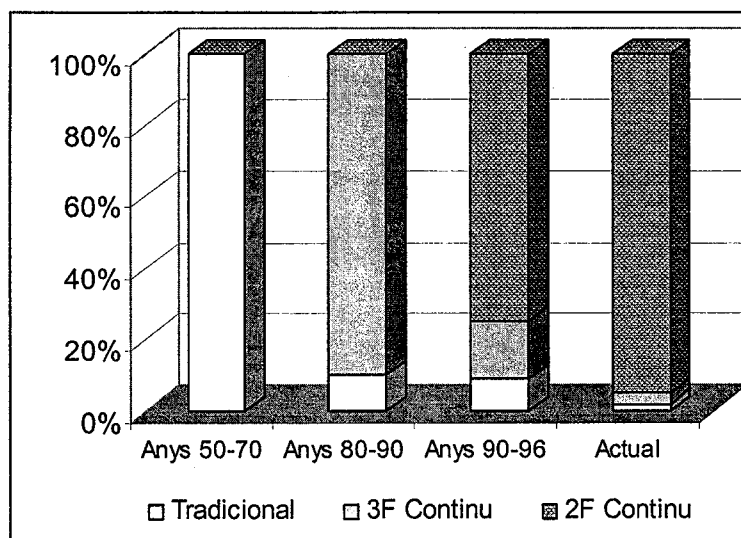


Figura 1.1.8. Evolució històrica dels sistemes d'extracció emprats a l'Estat Espanyol per a la producció d'oli d'oliva. Dades en percentatge respecte al total.

Taula 1.1.3. Evolució de la producció de residus de l'extracció de l'oli d'oliva a l'estat espanyol. Dades en milions de tones per any. (Agencia del Medio Ambiente; 1992; Pina Artal, 1997; Improlive, 2000.

Sistema d'extracció	Sub-productes	Anys 50-70	Anys 80-90 (camp. 87-88)	Anys 90-96 (camp. 96-97)	Actual (camp. 00-01)
Tradicional	Oliassa	0,905	0,121	0,108	0,048
	Pinyolada	1,325	0,178	0,160	0,070
3 F Contínua	Oliassa	-	3,618	0,832	0,194
	Pinyolada	-	1,748	0,400	0,094
2 Fases Contínua	Pinyolassa	-	-	2,350	3,683
	Aigua residual	-	-	0,045	0,070
Total Residus		2,230	5,665	3,895	4,160
Total olives processades		2,500	3,350	4,000	4,800

1.1.2. L'oliassa, com a subproducte

Fent un breu repàs a la paraula oliassa, el professor P. Fabra ens proporciona unes primeres dades interessants sobre la mateixa, que la defineix com: "aigües que s'obtenen en l'elaboració de l'oli, procedents de l'oliva i que es recullen a l'infern; solatge de l'oli", i per infern s'entén: "lloc retret, subterrani, on es guarden coses que no convé que vegi tothom, on es recullen els solatges d'una operació, on hi ha el motor de certs mecanismes com el d'una premsa d'oli". La Real Academia de la Lengua Española defineix "alpechín" com: "líquido oscuro y fétido que sale de las aceitunas cuando están apiladas antes de la molienda, y cuando, al extraer el aceite, se las exprime con auxilio del agua hirviendo".

Aquesta paraula *al-pechin* és mozarab, i prové del llatí *faecidus* que significa "de la femta". Un sinònim d'origen llatí, és *tinaco* que prové de tina, ens indica on s'emmagatzemava l'oliassa per evitar el seu abocament, també s'empra el nom àrab castellanitzat com *jámila* (aigua que corre de les olives). A d'altres països amb tradició oleícola rep noms específics, així mateix en italià és "acqua de rifiuto", en francès "les margines" y "mouga" o "kastigaros" en grec.

Totes aquestes definicions denoten que es tracta d'un residu desagradable degut a la mala olor que es produeix durant la seva descomposició.

Com a definició més àmplia i completa tenim que l'oliassa o morca és el residu líquid aquós, que es separa per sedimentació o centrifugació en el procés d'extracció de l'oli d'oliva mitjançant sistemes de tres fases. Conté l'aigua de vegetació de l'oliva i les aigües utilitzades en els processos d'extracció i neteja (de l'oli i olives). És el residu que es produeix en les diferents etapes del processat de l'oli. Aquest residu representa en sí un problema mediambiental.

1.1.2.1. Naturalesa, composició i característiques

L'oliassa té una composició variable, l'aparença és de suc tèrbol de color roig fosc o negre que varia amb el pH (rogenc a pH àcid i verdós en alcalí). Té sabor amarg, forta olor desagradable característica i aspecte brillant.

El component principal és l'aigua, per tant els compostos majoritaris són els hidrosolubles que provenen de les olives, lleugerament modificats respecte els que tenen els fruits, degut al procés d'extracció. També conté substàncies lipòfiles, restes d'oli no recuperat i material en suspensió, restes de polpa i de pinyols. Tots aquests components, dissolts, en suspensió i emulsió formen una mescla força estable (Fiestas i Borja, 1990).

La composició de l'oliassa depèn de nombrosos factors com són les condicions climàtiques, el tipus de sòl, la varietat i moment de la recol·lecció de les olives (per tant varia d'una campanya a una altra), i, fonamentalment depèn del sistema emprat en l'extracció de l'oli (Ramos-Cormenzana, 1986). Tot això fa que la composició de les oliasses sigui molt variable i justifica les variacions que apareixen a la bibliografia en les anàlisis dels mateixos paràmetres fets per diferents autors.

1.1.2.1.1. Característiques físico-químiques

Com pot observar-se a la taula 1.1.4 l'oliassa és un líquid tèrbol, aquós, àcid, salí, amb material en suspensió, i ric en matèria orgànica que li proporciona elevat poder reductor.

Taula 1.1.4. Característiques físico-químiques de l'oliassa en funció del sistema d'extracció emprat (Martínez et al., 1986 i González et al., 1994). DBO₅: demanda biològica d'oxigen. DQO: demanda química d'oxigen.

Paràmetre	Sistema Tradicional	Sistema Continu 3F
pH	4,5-5,0	4,7-6
Densitat (g L ⁻¹)	1,05-1,2	1,05-1,2
Potencial redox (mV)	-80 a -330	-80 a -330
Conductivitat elèctrica (dS m ⁻¹)	8-22,5	8-22,5
Color (U Pt-Co)	52.270-180.000	52.270-180.000
Terbolesa (UNT)	42.000-65.000	42.000-65.000
Matèria seca (%)	5,5-18,8	3,9-6,6
Sòlids en suspensió (g L ⁻¹)	5-10	0,5-1
DBO ₅ (g L ⁻¹)	90-100	35-48
DQO (g L ⁻¹)	60-195	45-100
Tensió superficial (erg. cm ⁻²)	40	40
Tensió interfacial (erg. cm ⁻²)	10	10

Aquest sistema col·loidal es comporta com una solució tensoactiva de gran estabilitat degut a la formació d'agregats lipoproteics durant l'extracció de l'oli. El sistema resta estable encara que es dilueixi al 100%. A més té un marcat efecte tampó àcid (entre 4 i 5 unitats de pH) degut a l'elevat contingut en àcids i sals orgàniques (Martínez Moreno, 1972).

Les diferències quant a les característiques de l'oliassa segons el sistema d'extracció es deuen, en part, a l'efecte de dilució per l'aigua addicionada.

1.1.2.1.2. Composició química

L'**aigua** (taula 1.1.5), component majoritari, acostuma a ser superior al 80% en pes i prové del teixit vegetatiu de les olives (les olives contenen entre un 40 i un 50% d'aigua), més l'afegida en les diferents etapes de l'elaboració de l'oli (rentat de les olives, procés de batut i centrifugat).

Taula 1.1.5. Principals components de l'oliassa. Valors adaptats de Martínez et al (1986), González et al. (1994) i Borja et al. (1990). Entre parèntesi valors mitjans.

Component	Sistema Tradicional	Sistema Continu 3F
Aigua (% sobre pes sec)	82,4-94,5	82,4-94,5
Substàncies orgàniques (%)	3,96-16,5 (10,5)	1,5-16,5 (3,5)
Matèria mineral (%)	0,4-7,5 (2,5)	0,4-7,5 (0,5)

- **Matèria mineral**

L'oliassa conté aproximadament un 2% de sals, de les quals el 80% són solubles (Fiestas, 1953). La part soluble està formada per carbonats, clorurs i sulfats de potassi i sodi; la insoluble està constituïda per silicats, carbonats de calci i magnesi i fosfats càlcics i fèrrics. És interessant destacar que el 60% de les sals són potàssiques i en menor mesura de calci i magnesi (taula 1.1.6).

Convé destacar que les oliasses contenen baixes concentracions d'elements potencialment tòxics com els metalls pesants, fet que s'ha de tenir en compte per a les possibles opcions de valorització del residu.

Taula 1.1.6. Composició mitjana de les principals substàncies minerals de l'oliassa (Fiestas, 1986; Paredes, 1999).

Paràmetre (g L⁻¹)	Sistema Tradicional	Sistema Continu 3F
K	7,2	2,7
P	1,1	0,3
Na	0,9	0,3
Ca	0,7	0,2
Mg	0,4	0,1
Fe	0,07	0,02
Zn	0-0,082	0-0,031
Cu	0-0,044	0-0,014
Mn	0-0,053	0-0,001
Co	0-traces	0-traces
Carbonats	3,7	1,0
Sulfats	0,4	0,15
Clorurs	0,3	0,1
Silicats	0,05	0,02

- **Substàncies orgàniques**

A la taula 1.1.7 es detallen els compostos orgànics que pot contenir l'oliassa i que poden arribar a representar el 15% en pes. Aquesta matèria orgànica pot trobar-se dissolta, en suspensió o en emulsió.

Taula 1.1.7. Composició de les principals substàncies orgàniques descrites a l'oliassa (Fiestas, 1986).

Component (g L⁻¹)	Sistema Tradicional	Sistema Continu 3F
Sucres totals	20-80	5-26
Substàncies nitrogenades	5-20	4-17
Àcids orgànics	5-10	2-4
Polialcohols	10-15	3-5
Pectines, mucíl·lags, tanins	10-15	2-5
Polifenols	10-24	3-8
Polímers	0,5-1,5	0,5-1,5
Greixos	0,3-10	5-23

• **Sucres**

Els sucres formen entre el 2 i el 8% de la matèria orgànica. S'ha pogut identificar per cromatografia de capa fina glucosa, fructosa i traces de sacarosa en forma lliure. Sotmetent l'oliassa a hidròlisi àcida apareixen a més a més galactosa, arabinosa, xilosa i àcid galacturònic que estan integrats en una fracció polisacàridica, en forma de polímers o glucòsids (Ragazzi i Veronese, 1967). També s'han identificat polisacàrids integrats per pectines, mucíl·lags i hemicel·lulosa. Els sucres es troben també a les olives en quantitat i qualitat que depèn de la varietat d'oliva i grau de maduració d'aquesta. La quantitat de sucres acostuma a disminuir amb la maduració de les olives (Fernández-Bolaños et al., 1993). El contingut de sucres a l'oliassa també acostuma a disminuir durant el seu emmagatzematge degut a la seva incorporació a la matriu polimèrica o a la transformació en altres compostos per l'acció dels microorganismes.

• **Àcids orgànics**

Els àcids orgànics de naturalesa no fenòlica suposen entre el 0,5 i el 1,5% de la matèria orgànica i són els components que contribueixen a acidificar l'oliassa, entre ells trobem: els àcids acètic, fumàric, glicèric, làctic, màlic, malònic, tartàric, tricarbànlic, oxàlic, succínic, citracònic, cítric, múic, hexoic, benzoic, fenilacètic, mevalònic, glutàric, 2 hidroxiglutàric, ftàlic, quínic i ascòrbic, que van ser identificats per López (1977) mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un detector de masses (CG-MS).

- **Polialcohols**

També s'han aplicat tècniques de cromatografia d'alta resolució (HPLC) que ha permès la identificació de polialcohols com el manitol, inositol i arabinol (Fiestas, 1959; León Cabello et al., 1986).

- **Compostos fenòlics**

Durant els últims anys s'ha incrementat molt l'interès pels compostos fenòlics de l'oliassa, donat que se'ls considera els principals responsables del poder contaminant d'aquestes aigües. Abans d'estudiar-ne la composició convé fer un repàs dels **compostos fenòlics de l'oliva**, que es troben en concentració molt elevada en comparació a la majoria de fruites, arribant-se a assolir fins a 70 mg per gram sec, expressats com a àcid cafeic (Maestro-Durán et al., 1994). Aquests compostos estan directament relacionats amb el color i sabor de les diferents varietats d'oliva. El sabor amarg de les olives es deu a la presència d'oleuropeïna, glucòsid específic de l'olivera, anomenat així per Bourquelot i Vintilesco a principis del segle passat per referir-se al glucòsid amarg de les fulles, fruit i escorça de l'olivera. Més endavant Panizzi et al. (1965) en van elucidar l'estructura. A aquest compost se li atribueixen propietats com a hipotensor (Ficarra et al., 1991), inhibidor del creixement de lactobacils, antioxidant i protector de les plantes contra microorganismes (Maestro-Durán et al., 1993, Tranter et al., 1993). Per aquest motiu, per a preparar les olives de taula s'usa hidròxid sòdic per hidrolitzar la oleuropeïna i treure'n l'amargor. Els polifenols contribueixen notablement al color fosc de les olives. Les antocianes naturals (mescla de colorants violacis) que augmenten en concentració al llarg de la maduració, donen el color fosc a les olives madures (Vázquez Roncero et al., 1970), al mateix temps els polifenols de les olives s'oxiden fàcilment sobre tot en medi bàsic i són els responsables del color fosc de les olives ennegrides artificialment per oxidació (Garrido i Fernández, 1972; Brenes-Balbuena et al., 1992; de Castro, 2001).

Els fenols de les olives contenen principalment grups o-difenols. Les catequines (m-difenols) estan en quantitats molt petites i de leucoantocianines no se n'han trobat, els tanins condensats tampoc suposen una contribució important als polifenols de les olives (Vázquez-Roncero et al., 1970).

Entre els compostos fenòlics presents en les olives es poden distingir qualitativament els següents grups:

- Àcids fenòlics i derivats: àcid clorogènic, àcid p-cumàric (cis i trans) i cafeïl-glucosa (Vázquez Roncero et al., 1974a).
- Derivats del β -(3-4-dihidroxifenil) etanol ó 3-hidroxitirosol: com ara la oleuropeïna (èster del β -(3-4-dihidroxifenil) etanol amb un glucòsid de l'àcid elenòlic) i la demetiloleuropeïna (Ragazzi et al., 1973; Ryan et al, 1999).
- Flavonoides: rutina (quercetin-3-ramnoglucòsid), luteolin-5-glucòsid, luteolin-7-glucòsid, apigenin-7-glucòsid i quercetrina (Vázquez Roncero et al. , 1970a), verascòsid i ligstròsid (Ryan et al., 1999). La evolució d'aquests compostos durant la maduració ha estat estudiada per Amiot et al. (1986b) i Vlahov (1992).

Els **polifenols** i **fenols simples de l'oliassa**, als quals s'atribueixen efectes nocius mediambientals i que influeixen negativament en els processos de biodepuració, hi són presents en continguts variables depenent dels processos d'extracció i molts d'altres factors. La concentració oscilla entre 6.000 mg L⁻¹ (Fiestas et al., 1990) i 17.500 mg L⁻¹ (Pompei i Codovilli, 1974), i en són especialment abundants els o-difenols.

Per la similitud amb els productes d'hidròlisi de la lignina, l'origen més probable d'aquests compostos és el pinyol (llavor) de les olives. Altres compostos, en canvi, provenen del mesocarpi. Durant el premsat i batut de les olives, els glucòsids fenòlics sofreixen hidròlisi i oxidacions, tant químiques com enzimàtiques, així com fenòmens de polimerització dels o-difenols fins a la formació de polifenols degut a enzims com ara el polifenoloxidasas (Vázquez Roncero, et al., 1974).

A continuació es mostren els diferents tipus de fenols aïllats de l'oliassa per diferents autors i que es poden classificar en: àcids fenòlics i derivats (taula 1.1.8), aldehids i alcohols fenòlics (taula 1.1.9), derivats del tirosol i β -(3,4 dihidroxifenil)etanol (taula 1.1.10), flavonoides (taula 1.1.11) i polímers:

Taula 1.1.8. Àcids fenòlics (mg L⁻¹) aïllats per diversos autors a les oliasses. nq: no quantificat.

Compost	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(11)	(12)	(13)
Àc.cafèic	nq	nq	nq	90							276
Àc vainílic			nq	242	0-370			nq			
Àc siríngic				710		nq		nq			39
Àc ferúlic								nq			
Àc protocatèquic	nq	nq	nq			nq					
Àc cumàric							nq		nq		13
Àc p-OHbenzoic					590				nq	70	
Àc m-OHbenzoic										28	
Àc trimetoxibenzoic				80							
Àc 2,6 diOHbenzoic					0-1060						
Àc 2,4 diOHbenzoic											52
Àc cinnàmic					0-240						49
Àc di OHcinnàmic						nq				35	
Àc veràtric				500		nq					
Àc dihidrocafèic						nq					
Àc p-OHfenilpropioníc								nq			23
Àc m-OHfenilpropioníc									nq		70
Àc 3,4-diOH fenilpropioníc											12
Àc p-OHfenilacètic				145							23
Àc 3,4-diOHfenilacètic						nq					89
Àc 2,3-diOHfenilacètic											16
Àc 3,4-diOHmandèlic							nq				
1-cafeilglucosa			nq								

Taula 1.1.9. Aldehids i alcohols fenòlics (mg L⁻¹) aïllats per diversos autors a les oliasses. nq: no quantificat.

Compost	(7)	(8)	(9)	(11)	(12)	(13)
p-OH benzaldehid		nq				
Vainillina		nq				
Siringaldehid		nq				
Esculetina	nq					
Catecol			nq	nq	234	252
4 metilcatecol			nq			512
3 metoxifenol				nq		

Taula 1.1.10. Derivats del tirosol i el β-(3,4 dihidroxi) feniletanol (mg L⁻¹) aïllats per diversos autors a les oliasses. nq: no quantificat.

Compost	(1)	(3)	(10)	(11)	(12)	(13)
Tirosol		nq			173	342
β-(3-4di-OH)feniletanol		nq			438	
4-glucòsid β-(3,4-diOHfenil) etanol		nq				
Oleuropeïna		nq				
Demetilooleuropeïna				nq		
OH-tirosol(-(3-OHfenil)etanol	nq					
tirosol (3-OHfenil)etanol	nq	nq				
4-OHfeniletanol		nq				
4-OHtirosol monoglucòsid				nq		

Taula 1.1.11. Flavonoides (mg L⁻¹) aïllats per diversos autors a les oliasses. nq: no quantificat.

Compost	(2)	(3)
Apigenina		nq
Cianidina	nq	
Flavanona o flavanol		nq
Luleolina		nq
Lutein-7- glucòsid		nq
Pirocatequina	nq	
Quercetina		nq

- (1) Pompei i Codovilli (1974).
- (2) Ragazzi i Varonesse (1967).
- (3) Vázquez Roncero et al. (1974).
- (4) Balice i Cera (1984).
- (5) López et al., (1977).
- (6) Carola et al., (1975).
- (7) León (1990).
- (8) Sáez (1989).
- (9) Capasso et al. (1992).
- (10) Scalzo i Oriente (1993).
- (11) D'Annibale (1998).
- (12) D'Annibale (1999).
- (13) Casa et al. (2003)

Els **compostos fenòlics polimèrics** també són característics de l'oliassa i en reflecteixen la seva coloració marró fosc-negre, és tracta d'un **pigment**, descrit per primer cop per Ragazzi et al. (1967), al qual es va atribuir una estructura tipus catecol-melanina. La possible explicació a la formació del pigment és la presència d'enzims (catecolases, cresolases, lacases, peroxidases, etc.) a la polpa de les olives que són alliberats durant la mòlta (en l'extracció de l'oli). Aquests enzims en entrar en contacte amb els polifenols formen el polímer. Quan hi ha presència d'aminoàcids i proteïnes els fenols s'hi uneixen via nucleofílica formant aminofenols.

Aquests estudis s'han completat per Saiz et al. (1986) que van demostrar que la naturalesa del polímer és molt complexa i que hi intervenen mono i polisacàrids, fenols lliures o polimèrics, flavonoides, antocians i específicament l'oleuropeïna. També hi son presents proteïnes, lípids i metalls en forma de sals. Pérez (1988) ha pogut establir una analogia entre aquest pigment i la lignina mitjançant l'oxidació lleu del pigment en medi àcid i òxid de coure, identificant per HPLC els àcids protocatèquic, p-hidroxibenzoic, vainílic, siríngic, p-hidroxifenilpropioníc, cumàric, siríngic, siríngaldehyd i la vainillina.

Tot i que no s'ha pogut determinar el pes molecular exacte del pigment, sí que se n'ha fet una estimació. S'han considerat tres fraccions diferents: una de pes molecular aproximat de 100.000 que equival al 70% del pigment, dues fraccions de 50.000 i 100.000 que representen el 20%, i un polímer comprès entre 100.000 i 200.000 que representa el 10% restant (Ragazzi et al., 1967). Quant al seu origen s'assenyala, com a causa més probable, la formació a partir d'oleocianina (ramnoglucoàsid de la cinidina) i altres polifenols de l'oliassa gràcies a presència d'enzims amb activitat catecolàsica i fenoloxidasas (Ragazzi i Varonesse, 1967).

Per tant, tots aquests estudis apunten a que el pigment de l'oliassa és un representant més del grup de fenols polimèrics naturals, d'origen vegetal, inclosos sota la denominació genèrica de lignina i compostos relacionats. Totes aquestes característiques fan que es tracti de substàncies amb baixa capacitat intrínseca de transformació i amb alta recalcitrància donat que la seva presència en residus en dificulta la biotransformació. Un exemple d'aquests fenols polimèrics naturals amb elevada recalcitrància són les lignines i determinats compostos húmics del sòl.

- **Substàncies nitrogenades**

L'oliassa conté entre un 0,2 i 0,4% de nitrogen, i pràcticament tot correspon a formes orgàniques. La proporció dels diferents compostos nitrogenats és la següent:

- Nitrogen amínic i amoniacal 13,9-15,7%
- Nitrogen húmic i/o fúlvic 15,6-17,6%.
- Nitrogen monoamínic 25,9-29,4%.
- Nitrogen imínic 33,61-36,46%.

En el residu sec Ielmini et al. (1976) van aïllar 19 aminoàcids i Saiz et al. (1986) n'han identificat 18 en hidrolitzar el polímer de l'oliassa.

- **Greixos**

La presència de greix a l'oliassa indica una extracció deficient de l'oli durant l'obtenció. Però com que en tot procés industrial no s'obtenen mai rendiments del 100%, sempre en queda un residu, petita quantitat d'oli que oscilla entre el 0,5 i el 1% si se separa per simple decantació, donat que l'oli es troba

formant una emulsió molt estable. En cas de que l'oliassa es passi per una centrifuga per recuperar l'oli residual, l'oli que resta és aproximadament d'un 0,03%.

L'oli d'oliva està format per una fracció majoritària saponificable, que representa la major part del pes total, entre el 98 i el 99% formada per triglicèrids (Montedoro i Garafaldo, 1984). Aquests es diferencien en funció de la composició d'àcids grassos. L'àcid gras més abundant de l'oli d'oliva és l'àcid oleic (55-83%) que és monoinsaturat, encara que també en conté de saturats (palmitic i esteàric) que representen entre el 6 i el 20% i els poliinsaturats (linoleic i linolènic) que poden estar en quantitats del 3 i el 20% (COI, 1985). La fracció insaponificable està formada per terpens, clorofil·les, tocoferols, esterols, compostos fenòlics i substàncies aromàtiques (Mataix i Martínez, 1988).

1.1.2.1.3. Càrrega microbiana

La presència de **microorganismes** a l'oliassa està limitada principalment pel pH, la presència de compostos fenòlics i àcids grassos. Tot i així s'han aïllat càrregues de microorganismes aerobis i facultatius de 10^5 UFC/ml (Ramos-Cormenzana, 1986). Segons Millán et al. (1995) hi predominen els fongs 49%, llevats 26% i bacteris 24%, dels quals el gènere que més hi abunda és *Pseudomonas*. Quant als microorganismes anaerobis, principals responsables de les males olors, degut als bacteris metanogènics, aquest grup representa l'1% de la microflora total (Fiestas et al., 1982). De totes maneres, la càrrega microbiana de les oliasses sembla ser insuficient perquè s'estableixi un procés de degradació biològica amb bon rendiment i, per tant, es fa necessari l'aport d'inòculs per a estimular el creixement microbià (Mercadé et al., 1994).

No s'han detectat microorganismes patògens a l'oliassa (Mouncifit et al., 1993). Tot i que poden contaminar-se si es mesclen amb altres aigües residuals de les almàsseres.

1.1.2.2. Poder contaminant i toxicitat

Com ja s'ha indicat en l'apartat referent a la naturalesa i característiques de l'oliassa, són molts els components que poden contribuir al poder contaminant i tòxic de l'oliassa. L'impacte ambiental del residu es centra sobre tot en els greus problemes que pot causar quan s'aplica sobre les aigües i sòls. L'impacte que sobre l'atmosfera pot generar l'oliassa s'ha considerat ínfim.

1.1.2.2.1. Poder contaminant

Potser la principal característica contaminant de les oliasses és l'elevada càrrega orgànica que contenen (DBO_5 i DQO). Si es compara amb les aigües residuals generades en altres indústries agroalimentàries (taula 1.1.12) s'observa que és la més potencialment contaminant.

Tenint en compte que es generava aproximadament una mitjana d'un litre d'oliassa per quilogram d'oliva, en una campanya habitual de principis dels anys noranta on es molturaven anualment uns 4 milions de tones d'olives, ens podem fer una idea de la magnitud del problema ambiental que generava el residu.

Taula 1.1.12. Poder contaminant de les aigües residuals de diferents activitats agroalimentàries (Seoánez.Calvo, 1995; Raventós i Mas, 1999).

Activitat agroalimentària	Càrrega orgànica (DBO_5 mg O_2 L^{-1})
Almàsseres	35.000-100.000
Vinasses	20.000-30.000
Escorxadors	350-5.500
Làcties	450-3.200
Cerveseres	400-8.800
Conserves vegetals	1.100-1.700

A més, si es té en compte l'estacionalitat de la generació del residu (es genera de novembre a gener), suposant que l'oliassa té una DBO_5 mitjana de 50 g O_2 L^{-1} , i que la contaminació mitjana per habitant i dia és aproximadament de 90 g O_2 (Metcalf i Eddy, 1991). El potencial contaminant podria ser equivalent (en càrrega orgànica) al generat per una població d'uns 10 milions d'habitants durant un període de 2 mesos.

En el cas que l'oliassa s'aboqui a cursos d'aigua, sense un tractament de depuració previ, tenint en compte que les aigües porten, com a terme mig, uns 10 mg L⁻¹ d'oxigen dissolt, caldrien 5.000 litres d'aigua neta per cada litre d'oliassa per a la descomposició d'aquesta matèria orgànica en condicions aeròbiques. Els processos anaeròbics cal evitar-los, ja que provoquen males olors (Fiestas, 1958). Per tant l'abocament d'oliassa als cursos d'aigua generen alts requeriments d'oxigen, la qual cosa provoca greus problemes de contaminació, asfíxia de la flora i la fauna, i per tant el trencament de l'equilibri ecològic de les aigües receptores (Vílchez, 1982).

Altres característiques de l'oliassa com la coloració fosca, intensa, estable i permanent (fins i tot quan es dilueix al 0.5%) i la presència de sòlids en suspensió, fan que en cas de ser abocada en cursos d'aigua, l'enterboleixin dificultant el pas de la llum i evitant-ne els processos fotosintètics. A més, els sòlids sedimenten acumulant-se al fons i les voreres dels rius i l'oli emulsionat forma una pel·lícula superficial que pot dificultar la difusió de gasos i per tant l'oxigenació de l'aigua.

Les oliasses contenen també nitrogen i fòsfor que poden afavorir processos d'eutrofització de les aigües.

Fins fa poc temps l'oliassa s'abocava a la llera dels rius, essent fàcil de detectar una comarca olivatera pel color negre de les aigües dels rius i rierols, en època de funcionament de les almàsseres. Dels petits molins que molturaven la pròpia collita del nucli on eren enclavats, s'ha passat (per necessitats d'economia d'escala) a les grans almàsseres que concentren la producció d'oli de comarques senceres i també els punts d'abocament.

Durant els anys cinquanta, amb la finalitat de determinar la contaminació dels rius de la conca del Guadalquivir i estudiar l'impacte de l'oliassa, es van mostrejar les aigües dels rius en diferents èpoques. En aquell temps, s'observà que l'oliassa no produïa en general, una contaminació greu en les aigües dels principals rius d'Andalusia (Fiestas, 1958). Als anys setanta, degut a nous abocaments industrials i a l'augment del volum d'aigües residuals no depurades abocades, es va superar la capacitat d'autodepuració dels rius,

provocant que la majoria de conques quedessin fortament contaminades i en alguns trams dels rius es van generar zones anaeròbies. Això va fer que es trenqués l'equilibri biològic que existia anteriorment (Fidalgo, 1976). Històricament es recorden alguns abocaments accidentals, sobre tot a Andalusia, que obligaren a obrir en diverses ocasions les comportes d'alguns d'embassaments de la conca del riu Guadalquivir, per tal de diluir l'efecte de l'aport d'oliassa.

Aquests problemes no només afecten a España, sinó també a tots els països amb gran producció d'oli de la conca mediterrània on es generen al voltant de 30 milions de m³ d'oliassa anualment (Casa et al., 2003) com ara França, Itàlia, Portugal, Tunísia i Turquia.

Des de la campanya 1981/82 a l'Estat espanyol l'abocament d'oliasses a la llera pública està prohibit (RD. 3499/81) de manera que això provocà que es comencessin a buscar vies, mètodes i tècniques alternatives per a l'eliminació o l'aprofitament de l'oliassa.

Una de les alternatives més utilitzades ha estat emprar el **sòl** com a medi receptor. El possible impacte sobre el sòl està relacionat amb el pH del residu (Albi i Fiestas, 1960; Della Monica et al., 1978; Morisot i Tourier, 1986), valors elevats de salinitat (Morisot i Tourier, 1986), i l'elevat contingut en compostos fenòlics, àcids orgànics i greixos (Della Monica et al., 1979; Fiestas et al., 1981; Potenz et al., 1985; Morisot i Tourier, 1986). L'aport d'oliassa al sòl provoca també alteracions del cicle del nitrogen (Torres Martín et al., 1980; Morisot i Tourier, 1986; Pérez i Gallardo, 1987), efectes nocius sobre els conreus (Fiestas et al., 1981; Potenz et al., 1985; Pérez et al., 1986), canvis en l'activitat microbiana del sòl (Paredes et al., 1986; Flouri et al., 1990; Ruiz, 1997) i la possibilitat de contaminar aigües subterrànies (Della Monica, 1978 i 1979). Situacions d'aquests tipus també s'han produït a Catalunya, així per exemple al municipi de l'Ampolla (Baix Ebre) on l'abocament massiu d'oliassa provocà la contaminació del freàtic.

Tot i que l'impacte que pot ocasionar l'oliassa sobre la matriu **atmosfera** s'ha considerat molt petit, estudis recents delaten que l'aire interior de les almàsseres conté concentracions gens despreciables de fenols i diòxid de sofre,

i quan s'aplica oliassa al sòl també es volatilitzen part d'aquests contaminants durant tres o quatre dies (Rana et al., 2003).

1.1.2.2.2. Toxicitat

En nombrosos estudis s'ha intentat valorar el potencial tòxic de les oliasses, bàsicament s'han trobat tres tipus d'efectes tòxics: antibacterià, fitotòxic i toxicitat per a peixos.

• Propietats antibacterianes

L'activitat antibacteriana de l'oliassa va ser descrita per De Caro i Galamanini (1959), aquests autors ho atribuïen a compostos no volàtils i solubles en aigua, que apareixen a l'oliassa i que es van modificant al llarg del temps, encara que aquesta activitat persisteix després de cinc anys d'emmagatzematge.

S'han assenyalat tres grups de compostos com a responsables de l'efecte antibacterià de l'oliassa (Martínez et al., 1986). El primer correspon a la **oleuropeïna i derivats**. Segons Ragazzi i Varonese (1967a) l'activitat antibacteriana es deguda al tirosol i hidroxitirosol (derivats de la hidròlisi de la oleuropeïna). Fleming et al., (1973) sotmetent extractes d'oleuropeïna a hidròlisi àcida, van observar que l'efecte inhibidor és més gran sobre bacteris Gram positius que sobre Gram negatius, assignant l'efecte antibacterià a l'aglicó de l'oleuropeïna i també a l'àcid elenòlic que d'ella s'en pugui derivar. Garrido-Fernández i Vaughn (1978) van observar que l'oleuropeïna, inhibia el creixement de bacteris Gram negatius. Tassau i Nychas (1994 i 1995) van observar inhibició sobre l'activitat productora d'enterotoxina de *Staphylococcus aureus* i *Salmonella enteritidis*.

El segon grup de substàncies antibacterianes correspon als **àcids fenòlics** de l'oliassa. S'ha observat però, que si s'aïllen aquests compostos cal una concentració 5 vegades major que la que conté l'oliassa per obtenir el mateix efecte d'inhibició quan fan proves amb *Bacillus megaterium* (González et al. , 1990). Això indica que els àcids fenòlics poden contribuir a l'efecte antibacterià, però no són els màxims responsables d'aquest fenomen. En

aquest mateix estudi els autors observen que l'oli no produeix inhibició bacteriana, de manera que dedueixen que l'oli residual de l'oliassa no influeix.

Capasso et al., (1995) experimentà que els compostos fenòlics extrets de l'oliassa tenen activitat bactericida en assajos realitzats amb soques de *Corynebacterium michiganese* i *Pseudomonas syringe*. Resultats similars obtingué Martirani (1996) en assajos amb *Bacillus cereus*.

D'altra banda Borja et al. (1997) observaren al depurar oliassa anaeròbicament, que l'efecte inhibitor dels o-difenols sobre els microorganismes responsables de la metanogènesi és major que els corresponents monofenols; i també que els derivats de l'àcid cinnàmic tenen major grau de toxicitat que els derivats de l'àcid benzoic.

El tercer grup de substàncies antibacterianes són els **àcids grassos lliures**. González et al. (1990) experimentant amb els àcids linoleic, oleic, làuric i mirístic observaren que presenten propietats antibacterianes.

Mitjançant assajos de biotoxicitat pel mètode de Microtox®, l'oliassa produeix la inhibició del 50% de l'activitat lumínica del *Photobacterium phosphoreum* a concentracions d'oliassa que van del 0,5 al 1,25% segons diferents oliasses i autors (Borja et al., 1993; López, 1996), per tant és un efluent considerat com a residu tòxic segons la legislació estatal (Orden de 13 de octubre de 1989, por la que se determinan los métodos de caracterización de residuos tóxicos y peligrosos).

En assajos efectuats sobre fongs també s'ha demostrat que l'oliassa té propietats antifúngiques (Tardioli et al., 1997).

Altres estudis mostren l'efecte antimicrobià de l'oliassa quan aquesta s'aplica sobre el sòl. En general l'aport d'oliassa al sòl augmenta l'activitat microbiana d'aquest (Potenz et al., 1980; Paredes et al., 1986) però es produeix la reducció inicial de les poblacions de bacteris esporulats (Paredes et al., 1986) i desequilibris entre les poblacions de bacteris desnitrificants i nitrificants (Torres Martín et al., 1980). En canvi, d'altres estudis no troben diferències significatives en el recompte de microorganismes totals, fixadors de nitrogen

atmosfèric i microorganismes solubilitzadors de fosfats en aplicar diferents dosis agronòmiques d'oliassa a sòls amb diferents tipus de conreus (Ruiz, 1997).

El més probable és que l'efecte antibacterià de l'oliassa no pugui ser atribuït a un únic compost sinó a l'efecte sinèrgic de diferents grups de compostos. Aquest efecte antibacterià observat, dificulta els processos de depuració de l'oliassa per via biològica (Borja et al., 1995b).

- **Propietats fitotòxiques**

Un dels efectes observats per diferents autors quan s'aplica oliassa al sòl és la fitotoxicitat (Morisot, 1979). Aquest efecte és observat per alguns agricultors de les zones oleícoles de Tarragona (Montsià i Baix Penedès) que manifesten que, quan en ocasions s'han aplicat grans dosis d'oliassa (reg a manta), de vegades moren algunes oliveres.

Pérez et al. (1986b) van observar dos efectes a diferents nivells. Per una banda l'oliassa inhibeix la germinació de diferents llavors i per l'altra repercuteix negativament en el creixement vegetal d'espècies com la civada, raves, tomàquets, *lotium sp.*, pèsols i mongetes. Aquest efecte l'atribuïen tant a la càrrega orgànica com a l'elevada salinitat de l'oliassa, que actuen de forma sinèrgica. D'aquests dos components sembla ser que la càrrega orgànica és la més influent en la fitotoxicitat de l'oliassa, sobretot pel que fa als fenols presents (Casa et al., 2003).

Altres autors observen que l'efecte d'inhibició de la germinació quan s'aplica oliassa al sòl depèn de la dosi i aquest efecte disminueix en el transcurs del temps (Flouri et al., 1990). Aquesta disminució de la fitotoxicitat pot estar relacionada amb la disminució del contingut dels compostos fenòlics i àcids volàtils (Levi-Minzi et al., 1992; Riffaldi et al., 1992). En assajos "in vitro" s'han identificat com a compostos més fitotòxics al catecol, el 4-metilcatecol i llurs diacetats, tot i així en absència de compostos fenòlics la fitotoxicitat no desapareix, per tant la fitotoxicitat no és atribuïble únicament a aquests, sinó també a d'altres compostos tant orgànics com inorgànics (Capasso et al., 1992).

La presència de compostos fenòlics lliures en sòls naturals s'ha relacionat amb fenòmens d'allelopatia, que consisteixen en la inhibició del creixement d'un vegetal degut a l'alliberació de substàncies per part d'un altre vegetal (Guenzi i McCalla, 1966; Steen et al., 1994).

- **Toxicitat per a peixos**

Existeixen pocs estudis de la toxicitat de l'oliassa per a organismes animals. Assajos efectuats amb barbs (*Chondrostoma polypepsi*) i carpes (*Cyprinus carpio*) indiquen que els límits de tolerància mitjana, oscil·len entre concentracions del 8,8% d'oliassa per les primeres 24 h i 6,8% durant 48 h. La toxicitat s'atribueix a l'elevada demanda biològica d'oxigen que genera l'oliassa, per l'alt contingut en substàncies orgàniques biodegradables (Fiestas, 1958 i 1977).

1.1.2.3. Marc legal

El procés d'industrialització del sector de l'oli d'oliva, iniciat als anys 50, ha anat afectant cada vegada més a les lleres públiques. Nous abocaments i llargues sequeres van contribuir a que durant els anys 70 l'abocament d'oliassa fos el primer problema de contaminació d'aigües continentals a Andalusia (Agencia del Medio Ambiente, 1995). Tot això creà la necessitat d'un major control dels abocaments i es promulgà el Reial Decret 3499/81 de 4 de desembre, en el que es dictaminaven mesures per evitar la contaminació dels rius de la Conca del Guadalquivir per residus d'almàsseres i la Ordre de 9 de juny de 1982, per la que es dictaren normes complementàries per l'aplicació del citat Reial Decret, prorrogat pel Reial Decret 2835/82 de 15 d'octubre.

Segons aquestes disposicions es declarava d'utilitat pública la realització d'obres i dispositius que suposessin l'eliminació dels vessaments d'oliassa als rius i al mateix temps es va establir una política de subvencions, la majoria de les quals s'empraren per a la construcció de basses d'evaporació.

Mitjançant el Reial Decret 849/1986 s'aprovà el "Reglamento del Dominio Público Hidráulico" (R.D.P.H.) en el que es fixa la concentració màxima permesa d'una sèrie de paràmetres a les aigües que han de ser abocades a la

llera pública tant directament (riu, riera, torrent, canal, etc.) com indirectament (clavegueram públic o privat que desembogui a la llera pública, abocaments al sòl o subsòl) a la llera pública. Mai en cap cas, sense prèvia autorització, es poden superar els límits indicats en la taula 1 del R.D.P.H.

A la taula 1.1.13 pot comprovar-se com alguns d'aquests límits es veuen àmpliament superats per alguns paràmetres de les oliasses (sòlids en suspensió, DQO, DBO₅, olis i fenols) i per tant és evident que l'abocament d'aquests residus a la llera pública queda totalment prohibit.

Taula 1.1.13. Comparació d'alguns paràmetres del Reglamento del Dominio Público Hidráulico (RD 849/1986) amb la composició mitja de les oliasses generades pel sistema tradicional i continu de tres fases. Unitats en mg L⁻¹, excepte el pH.

Paràmetre	Oliassa tradicional	Oliassa Contínua 3F	RD 849/1986		
			Taula 1	Taula 2	Taula 3
pH	4,5-5	4,7-6	5,5-9,5	5,5-9,5	5,5-9,5
Sòlids suspensió	5.000-10.000	500-1.000	300	150	80
DBO₅	60.000-195.000	45.000-100.000	300	60	40
DQO	90.000-100.000	35.000-48.000	500	200	160
Olis i greixos	300-1.000	500-23000	40	25	20
Fenols	10.000-24.000	3.000-8.000	1	0,5	0,5

A Catalunya l'any 1996 (Decret 34/1996) s'aprovà el Catàleg de Residus de Catalunya (CRC). En aquest decret s'engloben els residus en general, se'ls adjudica un codi d'identificació, i es classifiquen en tres categories (en funció dels continguts en determinats contaminants presents en el residu o en el lixiviat DIN 38414-S4): residus inerts, no especials i especials. A aquests últims a més, se'ls assigna un índex de perillositat: baixa, mitja o alta. També se'n determina la correcta gestió que ha de tenir cadascun dels residus. Segons aquest Catàleg, l'oliassa es considerava un residu **especial d'índex de perillositat baix**, degut fonamentalment a l'elevat contingut en carboni orgànic (TOC > 100 mg L⁻¹) i en fenols (índex de fenols >10 mg L⁻¹).

Amb l'aprovació de la Llei estatal 10/1998 de 21 d'abril, de residus, que defineix els residus perillosos com aquells que consten en la llista aprovada en el Reial Decret 952/1997, de 20 de juny, va afectar la classificació de determinats residus establerta pel CRC, cosa que justificà la necessitat de

modificar-lo. D'altra banda l'experiència assolida en l'aplicació del Catàleg feu també evident la conveniència d'introduir-hi algunes modificacions (Decret 92/1999, de 6 d'abril).

Com a trets destacables, el CRC modificat respecta l'estructura de grups i subgrups de l'anterior, introdueix modificacions en la classificació dels residus i no indica l'índex de perillositat.

L'oliassa en aquest Catàleg pertany al grup "Residus de l'agricultura, escorxadors i residus de la indústria alimentària", al subgrup "Residus de la indústria alimentària, excepte begudes", i al tipus de residus "oliasses o morques"; per tant té el codi 020208 i passa a classificar-se com a **residu no especial**. Per a la correcta gestió es contempla, per ordre de prioritat, la valorització utilitzant l'oliassa com a combustible o l'ús en profit de l'agricultura, i com a vies de tractament i disposició del rebuig els tractaments específics (que no especifica) o per evaporació.

L'ús de l'oliassa en profit de l'agricultura ve regulat en el Decret 290/1994, de 29 de setembre, sobre normes addicionals d'autorització d'almàsseres, en que es permet l'aplicació d'oliassa com a adob a una dosi màxima de **30 m³ per hectàrea i any**. L'Ordre de 28 d'octubre del 1994 es promulgà per a la concessió de subvencions (fins al 30% de la inversió) destinades a actuacions d'eliminació de la contaminació originades per les almàsseres.

A d'altres països de la mediterrània com Portugal i Itàlia també està permès l'ús d'oliassa com a fertilitzant. En el darrer cas, es limita el seu ús fins a una dosi màxima anual de 50 m³ per hectàrea i any si l'oliassa prové d'un molí de premses tradicional, i 80 m³ per hectàrea i any si es tracta d'un molí amb centrífuga contínua (Casa et al., 2003).

1.1.3. Mètodes d'eliminació, tractament i valorització

Davant la prohibició de l'abocament d'oliasses, els sistemes d'eliminació, tractament i valorització desenvolupats han estat molt diversos, des de la simple deposició de l'oliassa en basses d'evaporació fins a complexes sistemes de depuració amb microorganismes seleccionats. Altres estudis han desenvolupat sistemes de valorització del residu mitjançant l'extracció o transformació d'algun dels seus components i d'altres han aprofitat les característiques fertilitzants d'aquest per a emprar-lo com adob. A continuació es mostren alguns dels sistemes d'eliminació, tractament i valorització que s'han emprat, alguns a escala real i d'altres, per problemes de rendibilitat, s'han quedat en les primeres etapes d'investigació o s'estan encara desenvolupant.

1.1.3.1. Sistemes d'eliminació: Basses d'evaporació

Fou el sistema més emprat durant les dècades dels vuitanta i noranta (84% de les almàsseres). El procediment consisteix en anar acumulant l'oliassa en basses impermeabilitzades i de poca fondària, 100 cm d'alçada d'oliassa com a màxim, amb la finalitat de que s'evapori (afavorit pel clima mediterrani i el color fosc del residu) en el temps que transcorre entre campanyes. El residu resultant és una fracció de llot fonamentalment format per matèria orgànica més o menys estabilitzada, molt salí i ric en K_2O (5-10%) i P_2O_5 (1-2,5%) utilitzable com a adob o com a combustible (Fiestas, 1977).

Els inconvenients associats a l'ús de basses d'evaporació segons la Agencia de Medio Ambiente (1992) són:

- Es necessari disposar de grans superfícies lliures no massa lluny de les almàsseres (per disminuir costos de transport).
- Les basses dissenyades inicialment, a la llarga resultaren insuficients com a conseqüència de diversos factors com ara, la generació de més volum de residus de l'esperat, o donat que el residu es genera en època humida, els períodes d'intensa pluja poden provocar-ne el sobreiximent. Per tal d'afavorir l'evaporació s'han dissenyat sistemes

com ara la Hidrobomba eòlica CM-2000 que consisteix en una turbina que disposa d'uns aspersors i per l'acció del vent obliga a fer sortir l'oliassa per aquests en forma de gotes molt petites que són fàcilment evaporades en entrar en contacte amb l'aire.

- La mala conservació o insuficient impermeabilització, pot provocar filtracions o el trencament de les basses que pot comportar risc de contaminació d'aigües superficials i subterrànies.
- Generació de males olors i proliferació d'insectes, com a conseqüència d'un mal disseny de les basses, que amb la finalitat d'estalviar terreny es fan més profundes afavorint les fermentacions anaeròbies que produeixen males olors. Cal evitar situar-les en zones properes a nuclis urbans i orientar-les adequadament per a què els vents dominants no bufin en direcció de poblacions properes.

Als anys 80 a la conca del Guadalquivir es van inventariar quasi 2.500 basses amb una superfície mitjana de 910 m² per bassa, de les quals aproximadament un 15% estaven en mal estat (Rodrigo, 1990).

Tots aquests fets fan que als anys 90 es plantegin nous objectius amb la finalitat de trobar tecnologies netes de depuració per substituir les basses.

1.1.3.2. Sistemes de tractament

Els sistemes de tractament es basen, en general, en reduir el poder contaminant de les oliasses (particularment la càrrega orgànica) per després abocar-les al medi. En aquests sistemes generalment s'obté per una banda una aigua depurada (en condicions de ser abocada) i per l'altra un residu molt concentrat, no apte per a ser abocat, que caldrà tractar o disposar en un abocador.

Els sistemes de depuració proposats per diferents autors son molt variats i es poden classificar en: físics, químics i biològics.

1.1.3.2.1. Sistemes de tractament físic

Se'n pot distingir quatre menes: ultrafiltració, osmosi inversa, crioconcentració i concentració tèrmica. Tot seguit es descriuen els aspectes fonamentals de cadascun:

- **Ultrafiltració**

Consisteix a fer passar l'efluent a depurar per membranes orgàniques o ceràmiques de diferent porositat per treure'n tant la càrrega orgànica com la mineral en forma col·loidal o dissolta (en cas de que es tracti de molècules d'elevat pes molecular). A diferència de l'osmosi inversa necessita pressions relativament baixes, normalment inferiors a 1.034 kN m^{-2} (Metcalf i Eddy, 1991). Mitjançant l'aplicació de tècniques d'ultrafiltració a oliasses s'ha aconseguit eliminar-ne l'oli i reduir en un 90% la demanda química d'oxigen (Mameri et al., 2000). Els principals desavantatges de la ultrafiltració és la formació de gels impermeables a la cara interna de les membranes i l'elevat cost dels suports i membranes (Ridgway et al., 1983) que el fan pràcticament inviable. Per a millorar el rendiment d'aquests sistemes aplicats a la depuració d'oliasses es fa necessària la combinació amb d'altres sistemes de depuració (Carrieri, 1978).

- **Osmosi inversa**

És un procés en el que se separa l'aigua de les sals i matèria orgànica dissoltes mitjançant la filtració per una membrana semipermeable (d'acetat de cel·lulosa o de nylon) en aplicar una pressió superior a l'osmòtica generada per les sals dissoltes en l'aigua residual. Els equips emprats actualment treballen a pressions de fins a 6.900 kN m^{-2} (Metcalf i Eddy, 1991).

Alguns autors a escala de laboratori han aconseguit reduir més d'un 90% la DQO de l'oliassa (Cordovilli, 1974; Reimers, 1983). Els inconvenients d'aquest sistema són també la formació de gels que impermeabilitzen les membranes, el cost i l'escassa experiència en el tractament d'aigües residuals d'aquestes característiques.

- **Crioconcentració**

Consisteix en sotmetre a l'oliassa a baixes temperatures (fins al punt de congelació) amb la finalitat de depurar i recuperar substàncies orgàniques d'interès, incloses les termolàbils. El sistema es basa en l'ús d'una columna criogènica on l'oliassa es refreda pel capçal de la columna causant la formació de cristalls d'aigua. Tant les substàncies solubles com les que hi són en suspensió tendeixen a anar a la fase líquida (no cristal·lina) i es van concentrant progressivament al fons de la columna. L'aigua congelada, posteriorment es fon i es considera depurada. La DQO d'aquestes aigües és d'uns 600-800 mg O₂ L⁻¹ (Franziona et al., 1986). El concentrat conté substàncies orgàniques valuoses que poden ser emprades en l'alimentació per a animals.

- **Concentració tèrmica i incineració**

Consisteix en evaporar tèrmicament l'aigua de l'oliassa mitjançant evaporadors. El concentrat resultant conté un 50% de matèria seca (que queda estabilitzada per efecte de la temperatura), gran concentració de sals i sucres solubles que li confereixen elevat valor energètic. L'aspecte físic és de líquid marronós, viscos i dens amb aromes afruitats i caramelitzat. A més, se li pot recuperar l'oli residual i es pot reutilitzar l'aigua evaporada. És un sistema que convé que s'efectuï immediatament finalitzada l'extracció de l'oli, per evitar fenòmens de fermentació que donen lloc a substàncies polimèriques de més difícil degradació (Valenzuela, 1986). El concentrat pot ser emprat també per a l'alimentació d'animals i en processos biotecnològics (García Viñao, 1989).

Un altre sistema tèrmic és la incineració. Un dels inconvenients és, però, l'elevat contingut en aigua que fa que no es pugui combustionar espontàniament i per tant calgui una gran despesa d'energètica. A més és desprenen gasos tòxics com els òxids de nitrogen (Fedeli, 1996) i degut a l'elevada càrrega en compostos aromàtics i l'alta temperatura emprada, poden formar-se també hidrocarburs aromàtics volàtils i altres compostos tòxics.

1.1.3.2.2. Tractament químic

Tot i que el procés químic no és el més adequat per usar en aigües d'elevada càrrega orgànica, s'han utilitzat agents floculants i oxidants per tal de reduir-la. Entre els agents floculants s'ha emprat l'òxid càlcic, sals de ferro (clorur fèrric i sulfat ferrós) i d'alumini (sulfat d'alumini) amb rendiments baixos (reducció de la DBO₅ al voltant del 40- 50%). Hi ha un inconvenient afegit que és el de generar grans quantitats de fangs que s'han de tractar posteriorment (Fiestas, 1977).

També s'han utilitzat agents oxidants com l'hipoclorit sòdic (Janer del Valle, 1980), l'aire, l'oxigen mitjançant la tecnologia Jet-Reactor (García et al., 1990), l'ozó (Benítez et al., 1997) i l'ozó combinat amb catalitzadors (normalment òxids metàl·lics), peròxids i llum ultraviolada (Benítez et al., 1997; Miranda et al., 2001a). Alguns estudis recents demostren que a nivell de laboratori és possible eliminar els compostos fenòlics de l'oliassa amb llum ultraviolada en presència d'agents fotosensibilitzants (Amat et al., 1999; Miranda et al., 2001b).

En molts casos els tractaments químic es combinen amb sistemes de depuració biològica.

1.1.4.2.3 Tractament biològic

Donat que l'oliassa és una aigua residual amb elevada càrrega orgànica, els mètodes de depuració per via biològica poden ser els més prometedors. Aquests es basen en l'eliminació dels contaminants orgànics gràcies a l'activitat microbiològica. La principal aplicació dels processos biològics és l'eliminació de substàncies orgàniques biodegradables presents en l'aigua residual, tant en forma col·loidal com en solució. Aquestes substàncies, es converteixen en gasos (CO i CO₂) que es poden alliberar a l'atmosfera, o són transformades en teixit celular biològic, eliminable per sedimentació (Metcalf i Eddy, 1991).

Per a qualsevol tractament biològic es fa necessari mantenir les condicions òptimes per a que els microorganismes es desenvolupin, així doncs cal que

es controli el pH, la conductivitat elèctrica, la temperatura, els nutrients (N,P,K) i la presència de substàncies tòxiques, com ara els fenols, que poden causar fenòmens d'inhibició del creixement microbià, provocant en molts casos una paralització o disminució de l'activitat en els reactors biològics (Maestro Durán, 1991). Aquest fet fa que de vegades s'opti per diluir l'oliassa abans de ser tractada. També cal controlar la població microbiana, donat que l'oliassa conté pocs microorganismes es fa necessari l'aportació d'inòculs i la presència o absència d'oxigen en determinarà si el sistema de depuració és aerobi o anaerobi.

Els paràmetres per al control del rendiment dels processos depuratius són: la DQO, DBO₅, el contingut de fenols i el color.

- **Sistemes de depuració aeròbics**

Consisteixen en l'eliminació dels compostos orgànics per microorganismes naturals o seleccionats que transformen en presència d'oxigen, aquests compostos en diòxid de carboni, aigua, nitrats i materials cellulars estables. En general aquests sistemes requereixen l'aportació addicional de nutrients. Segons Fiestas (1977) la proporció entre demanda biològica d'oxigen, nitrogen i fòsfor ha d'ésser aproximadament de 100:5:1, en cas contrari es fa necessari l'addició de nitrogen i fòsfor. Els rendiments mitjans obtinguts pels sistemes de depuració aeròbia estan en torn a la reducció del 80% de la DBO₅, quedant doncs una DBO₅ residual d'uns 13.000 mg O₂ L⁻¹ (Fiestas, 1977).

Donat que l'oliassa té pH àcid, baix contingut en nitrogen i presència de compostos derivats de la lignina, els microorganismes més emprats són els fongs ligninolítics de la família dels fongs de la podridura blanca. Aquests organismes segreguen enzims tipus ligninases, fenol oxidases i peroxidases que mineralitzen la lignina de la fusta. Aplicats a l'oliassa s'observa una disminució del contingut en fenols simples i la despolimerització de la fracció d'alt pes molecular que provoca la decoloració d'aquesta. Entre els fongs seleccionats més emprats trobem: *Aspergillus terreus* (Martínez Nieto et al., 1992), *Lentimula edodes* (d'Annibale et al., 1998, 1999), *Phanerochaete chrysosporium* (Sayadi et al., 2000), *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* i *Pleurotus ostreatus* (Martirani et al., 1996) i altres soques aïllades de l'oliassa (Amhajji et al., 2000).

En condicions de laboratori Martirani et al. (1996) observaren que el 90% dels fenols es degraden gràcies a les fenol oxidases, però la toxicitat de l'extracte no disminueix (en assajos efectuats amb soques de *Bacillus cereus*), sinó que fins i tot augmenta, això s'atribueix a la formació de radicals fenoxi i quinonoids.

Aquest sistema presenta certs inconvenients com són la necessitat d'una gran despesa energètica (normalment agitació per a oxigenar), cal aportar força nutrients i es produeixen grans quantitats de fangs residuals que després cal tractar encarint el sistema (Ubay et al., 1997), i són costosos de posar en marxa (Beccari et al., 1996).

- **Depuració anaeròbica**

En aquests processos es produeix la descomposició de la matèria orgànica, en absència d'oxigen molecular, a diòxid de carboni i metà. Aquesta transformació es produeix en tres etapes. El primer pas (hidròlisi) comporta la transformació per via enzimàtica dels compostos d'alt pes molecular en compostos que puguin servir com a font d'energia i carboni cel·lular. El segon pas (acidogènesi), implica la conversió bacteriana dels compostos produïts en la primera etapa, en compostos intermedis de menor pes molecular (àcids grassos volàtils, àcid acètic, fòrmic i butíric, etc.) i el tercer pas (metanogènesi), suposa la conversió bacteriana dels compostos intermedis en productes finals més simples, fonamentalment diòxid de carboni i metà (Metcalf i Eddy, 1991).

Aquest sistemes aplicats a la depuració d'oliasses presenten certes limitacions. Per una banda, la presència de fenols inhibidors endarrereixen el procés (Fiestas et al., 1982; Boari, 1993) i per l'altra, la formació d'àcids volàtils (sobre tot si es superen els 2.000 mg L⁻¹ d'àcid acètic) a l'etapa acidogènica provoca una baixada del pH que augmenta la toxicitat de l'oliassa (Maestro Durán et al., 1991). Tot plegat, provoca desequilibris entre les poblacions de bacteris acidogènics i metanogènics dificultant la depuració d'aquest residu (Fiestas et al., 1982). L'etapa metanogènica és la més sensible als canvis de substrat, pH i toxicitat, per tant cal controlar les condicions de forma acurada (Beccari et al., 1996).

Segons Beccari et al. (1996) els lípids es degraden tant en la fase acidogènica com metanogènica, en canvi els fenols no es degraden del tot en condicions acidogèniques i són quasi totalment degradats en condicions metanogèniques. En solucions sintètiques d'àcid p-hidroxibenzoic cal afegir glucosa al medi per a que es degradi en condicions metanogèniques, cosa que no es necessari en depurar l'oliassa ja que conté elevada quantitat de sucres (Beccari et al., 1996).

La reducció de la DBO₅ obtinguda per aquests sistemes és d'un 80% (Janer del Valle, 1980; Tsonis i Grigoropoulos, 1993) i al mateix temps es produeix biogàs que es pot utilitzar com a combustible. Per cada litre d'oliassa s'obtenen de 25 (Janer del Valle, 1980) a 57 (Ergüder et al., 2000) litres de biogàs.

Sense dubte la combinació de diferents processos pot fer augmentar el rendiment de la depuració. Entre les combinacions més emprades està el tractament químic precedit d'un tractament biològic (Petruccioli et al., 1988 a i b) o la combinació de dos tractaments biològics. Mercadé et al. (1994) proposaren primer fer un tractament biològic aerobi afegint com a inòcul llot de depuradora, aconseguint reduccions del 80% en la DQO i només un 30% en els fenols, degut a que els principals processos enzimàtics que permeten el trencament de l'anell aromàtic es realitzen en presència d'oxigen; després es fa una etapa aeròbica per acabar de reduir tant la DQO (92% de reducció) com, sobretot, els fenols (92%).

Altres autors (Maestro Durán et al, 1991; Borja et al., 1995a) proposen fer primer un tractament aeròbic, per reduir la concentració dels o-difenols i derivats de l'àcid cinnàmic i així evitar la toxicitat per a les bacteries metanogèniques, seguit d'un d'anaeròbic, observant-se així un increment de la velocitat de degradació en la etapa anaeròbia de 5 vegades. El rendiment obtingut amb aquesta combinació és d'un 92% de reducció en la DQO i un 99% en els fenols.

Altres autors proposen la reducció de la concentració de fenols mitjançant enzims (lacases) o fongs ligninolítics, seguida d'un tractament anaeròbic (D'Annibale et al., 1998 i 1999; Sayadi et al., 2000).

En referència als sistemes de depuració emprats, tot i que les taxes de reducció de la càrrega contaminant de les oliasses són molt altes, encara s'obtenen efluents amb DQO al voltant de 4.000-5.500 mg O₂ L⁻¹, que no són aptes per a abocar a la llera pública (RD 849/1986). Per tal d'obtenir una reducció de la càrrega orgànica apta per abocar a la llera (de 160 a 500 mg O₂ L⁻¹ de DQO) cal l'aplicació successiva de sistemes de depuració com el proposat per Fiestas i Borja, (1990) que consta de les següents etapes: bioconversió, biometanització, tractament aerobi i finalment un tractament físico-químic. Altres autors proposen l'ús d'ozó precedit per un sistema de depuració aeròbica (Benítez et al., 1997b), o l'oxidació amb hipoclorit sòdic seguida d'etapes de sedimentació, flotació, filtració per carbó actiu, aireació i ozonització (González et al., 1994).

1.1.3.3. Sistemes de valorització

Tot i que en general s'ha actuat sobre l'oliassa, des d'un punt de vista de controlar la contaminació que pot provocar sobre el medi ambient, mitjançant sistemes de depuració, també s'ha estudiat la possible valorització d'aquest residu ja sigui aprofitant directament alguns dels seus components o transformant-los (normalment per via biològica) en d'altres substàncies de valor que fan més rendibles els processos depuratius i en general el propi sector.

Ja als anys 50 en estudiar la composició de l'oliassa es va proposar el seu ús com a adob de tipus potàssic. El seu ús com a fertilitzant es comenta de forma més extensa en l'apartat 1.2.2.

1.1.4.3.1. Ús de microorganismes per a l'obtenció de productes d'alt valor afegit

Un dels sistemes més emprats ha estat l'ús de l'oliassa com a matèria prima o substrat per al desenvolupament de microorganismes que permeten obtenir productes d'alt valor afegit.

- **Producció de proteïnes**

Donat que l'oliassa conté sucres, una càrrega mineral considerable (excepte nitrogen, que se li ha d'afegir en forma de sulfat amònic o urea) i un pH adequat, s'hi poden desenvolupar fàcilment llevats que són aptes per a la producció de proteïnes. Qualitativament el llevat així obtingut, conté un 50% de proteïnes, hidrats de carboni, sals, greixos i vitamines (sobretot del grup B) i pot ser emprat en la fabricació de pinsos. Paral·lelament a la producció de proteïnes s'aconsegueix disminuir la DQO de l'oliassa un 60-70%. Tot això feu que s'arribessin a muntar diverses instal·lacions amb aquesta finalitat (Fiestas, 1977).

Amb el cultiu de fongs de la podridura blanca sobre oliassa diluïda, concretament diferents soques de *Pleurotus*, s'han emprat per a la producció de pinsos i aliments humans (Zervakis et al., 1996). També s'han usat algues per a l'obtenció de proteïnes a partir de l'oliassa (Ramos-Cormenzana et al., 1995).

- **Producció de biosurfactants**

Alguns autors han emprat l'oliassa per a la producció de biosurfactants. Mercadé et al. (1993) han demostrat que diferents soques del gènere *Pseudomonas* poden utilitzar l'oliassa com a font de carboni per a la producció de ramnolípid, afegint únicament nitrogen com a nutrient (NaNO_3). El rendiment aconseguit és de 0,058 grams de ramnolípid per gram de substrat.

- **Obtenció de biopolímers**

S'ha acoblat la producció de xantà a un tractament biològic aerobi d'oliassa utilitzant *Xanthomonas campestris* aconseguint-se rendiments de fins a 4,1 grams de xantà per litre d'oliassa (López, 1996; López et al., 2001).

- **Obtenció d'etanol**

La fermentació l'oliassa a partir de soques aïllades de l'oliassa, com ara *Candida wickerhamii*, *C. Molischiana* i *Saccharomyces cerevisiae*, han permès obtenir una concentració alcohòlica final d'1,3%, la qual cosa no sembla ser massa rendible (Bambalov et al., 1989).

- **Producció de biogàs**

El biogàs és una mescla de gasos formada principalment per metà (60%), diòxid de carboni (35%) i altres gasos minoritaris (vapor d'aigua, àcid sulfhídric, etc.) que es genera mitjançant un procés biològic anaeròbic. Té poder calorífic elevat (550 Kcal m³) i pot servir per a que el procés d'extracció de l'oli pugui ser autosuficient des del punt de vista energètic (Fiestas et al., 1982). La producció mitjana de metà és d'uns 37 m³ per m³ d'oliassa i un rendiment energètic de 325 kW h⁻¹, dels quals un 30% pot ser convertit en energia elèctrica i un 63% en energia calorífica utilitzant processos de cogeneració. Aquesta energia es prou alta com per cobrir les necessitats energètiques tant de l'almàssera com del reactor anaerobi per a depurar l'oliassa (Fiestas et al., 1996).

- **Producció de compost**

Els processos de compostatge consisteixen en una transformació aeròbica de la matèria orgànica en condicions controlades amb l'objectiu d'estabilitzar-la. Donat que l'oliassa conté elevada càrrega orgànica i no conté patògens serà susceptible de ser compostada, però en petits volums i junt amb d'altres residus ja que el seu contingut en aigua és massa elevat per garantir les condicions aeròbiques. També poden ésser compostats els llots o concentrats generats en els processos depuratius de l'oliassa o els que s'obtenen per l'evaporació directa. En aquest cas la quantitat a compostar pot ser major. Les limitacions de l'ús d'oliassa per a compostar són: l'**efecte antibacterià** que pot inhibir el creixement dels microorganismes responsables del procés i l'**efecte fitotòxic**. En estudis realitzats compostant tant l'oliassa com llots amb diferents residus (cotó, gallinasses, llots d'estacions depuradores d'aigües residuals, palla de blat) s'observa fitotoxicitat únicament a l'inici del procés (Monteoliva-Sánchez et al., 1996).

- **Producció d'enzims**

S'ha addicionat a l'oliassa microorganismes de l'espècie *Cryptococcus* per a l'obtenció de complexos enzimàtics amb activitat poligalacturonasa. Els enzims es recuperen en aquest cas per ultrafiltració (Petruccioli, 1988 ab).

1.1.3.3.2. Altres usos

- **Utilització de l'oliassa com a combustible**

Tant la pinyolada seca com l'oliassa concentrada tenen elevat poder calorífic (Vitolo et al., 1999) i poden servir com a combustible per a les etapes d'evaporació i assecat de la pinyolada.

- **Aprofitament de compostos de l'oliassa**

Alguns dels compostos fenòlics de l'oliassa són de gran interès alimentari i farmacèutic com ara polifenols, àcid maslínic, exopolisacàrids, polihidroxicanoats etc. (Ramos-Cormenzana i Monteoliva-Sánchez, 2000).

1.2. APLICACIÓ D'OLIASSA AL SÒL

L'aplicació de l'oliassa al sòl pot efectuar-se des de dos punts de vista, per una banda usar el sòl com a medi receptor de grans quantitats d'oliassa a fi i efecte d'eliminar-la i per l'altra, pot valoritzar-se aprofitant les propietats fertilitzants del residu si s'aplica a dosis adequades sobre sòls destinats al conreu.

1.2.1. Abocament massiu

És l'aplicació al sòl sense finalitat agrícola, amb l'objectiu d'aprofitar la capacitat autodepuradora del sòl i així aconseguir l'eliminació de l'oliassa, encara que això no exclou l'ús posterior del terreny per a conreus, després d'un període d'atenuació natural. Aquest sistema va ser proposat per Escolano (1975) per evitar l'abocament de les oliasses als rius. El sistema consisteix en dipositar l'oliassa sobre eres o llacunes per tal d'infiltrar-la i evaporar-la. En l'experiment en eres s'afegiren 200 L d'oliassa per m² de sòl observant-se que en 5 dies l'oliassa s'havia infiltrat 40 cm i el sòl presentava una crosta de 3 cm d'aspecte de lava o escòria esquarterada i granulada. En l'experiment en llacunes s'aplicaren dosis de 1.000 L m⁻² permetent una columna d'oliassa màxima de 40 cm per evitar fermentacions anaeròbies. Altres estudis (Dupuy et al., 1991) apliquen uns 13 L m⁻² dia⁻¹ fins un total de 1.000 L m⁻², amb la finalitat de depurar-la aprofitant la capacitat bloquejadora i depuradora del sòl.

Della Monica et al. (1980) proposaren la degradació de la càrrega orgànica de l'oliassa emprant un sòl agrícola preferentment calcari i de textura arenosa a arenollimosa, incubant-t'ho en un tanc, un cop incubat, el sòl enriquit en nutrients assimilables pot usar-se com a compost.

López et al. (1992) varen realitzar experiments amb lisímetres omplerts amb sòls calcaris i aplicaren dosis d'oliassa de 5.000 m³ ha⁻¹ observant la quasi eliminació total de la matèria orgànica, fòsfor i potassi de l'oliassa en analitzar els lixiviats resultants, fins i tot després de repetir el tractament durant 3 campanyes. Aquests mateixos autors (Cabrera et al., 1996 i López et al., 1996) aplicant dosis més grans tant en lisímetres com en experiments de camp

durant tres campanyes (fins a un total de 18.000 m³ ha⁻¹) observaren un fort augment del carboni oxidable, nitrogen i fòsfor, potassi i sodi assimilables. Però també adverteixen de la salinització del sòl i de la possible contaminació de les aigües freàtiques per sodi i nitrats.

La pràctica d'aquest mètode d'eliminació pot suposar un gran risc de **contaminació del propi sòl** (si es supera la capacitat autodepuradora) que pot manifestar-se mitjançant la salinització, contaminació per compostos orgànics (compostos fenòlics, àcids grassos, greixos, etc.), alteració de l'activitat microbiana, fitotoxicitat, etc. També pot causar la **contaminació d'aigües superficials** per escolament, ja que gran part de la càrrega orgànica de l'oliassa és soluble en aigua i per tant molt mòbil, i la **contaminació d'aigües subterrànies** per infiltració a través del sòl.

Per tant, aquest sistema requereix un estricte control de les dosis d'aplicació per adequar-les a la capacitat d'infiltració del sòl per evitar l'escolament superficial; calen característiques topogràfiques i hidrogeològiques del terreny adequades i un nivell freàtic prou profund, per garantir la no contaminació de les aigües subterrànies. La climatologia també serà un factor a tenir en compte en aquests casos.

Aquest sistema d'eliminació, resultat d'un ús inadequat del sòl, presenta molts inconvenients, ja que aquest, passa a ser un abocador incontrolat de residus amb un risc mediambiental difícil de preveure i, per tant està totalment desaconsellat.

1.2.2. Utilització agrològica

El sòl pot ser un medi adequat per rebre residus orgànics, tant per la seva capacitat depuradora com pel paper que la matèria orgànica té en la fertilitat del sòl i el reciclatge de nutrients a través del sistema sòl-planta, a més a més un altre motiu és la necessitat de matèria orgànica que té el sòl (Felipó i Garau, 1987) sobretot a l'àrea mediterrània. Donat que l'oliassa conté elevada càrrega orgànica, pot ser un residu valoritzable a través del sòl (Taula 1.2.1). Aquest sistema és sens dubte, el mètode de valorització més senzill i barat. Ja des de temps remots, l'any 234≈149 a.C, Marcus Porcius Cato recomana en el

llibre “*De agricultura*” l’ús d’oliassa per incrementar la fertilitat de la terra. Abu Zicaria a l’any 1148 recomana usar-la en oliveres, diluïda a la meitat i en poca quantitat.

Les principals característiques fertilitzants de l’oliassa es mostren a la taula 1.2.1. En general es pot afirmar que les oliasses són molt riques en potassi, tenen valors de fòsfor, nitrogen i magnesi, encara que en menor mesura que el potassi, dignes de ser tinguts en compte i, a més, contenen força matèria orgànica fet que millora les característiques físiques, químiques i biològiques del sòl. Tantmateix, no acostumen a contenir elements potencialment tòxics com ara els metalls pesants ni substàncies de orgàniques de síntesi, donat que es tracta de residus d’origen natural i en el procés de generació només intervenen processos de tipus físic (molturació, premsat, centrifugat) que no generen, en principi substàncies nocives.

Taula 1.2.1. Principals característiques agronòmiques de les oliasses.

Component (%)	Sistema tradicional	Sistema continu 3F
Matèria orgànica	10,5	3,5
Nitrogen	0,2	0,06
Fòsfor	0,1	0,03
Potassi	0,7	0,3
Magnesi	0,04	0,01
Aigua	82-94	82-94

Les oliasses però també tenen certes característiques desfavorables per a l’ús com a fertilitzant derivades de l’elevada salinitat i acidesa i la presència de substàncies fitotòxiques i antibacterianes.

Totes aquestes característiques, tant positives com negatives, fan que les oliasses siguin un residu molt complex i que quan són aplicades al sòl poden esdevenir canvis importants en les propietats d’aquest i que si s’usen com a fertilitzant cal prendre certes precaucions. Els efectes de l’aport d’oliassa al sòl han estat estudiats per nombrosos autors que es mencionen en l’apartat següent.

1.2.3. Efectes

L'aplicació d'oliassa al sòl pot comportar nombrosos canvis en les propietats físiques, químiques, fisico-químiques i biològiques del sòl que es consideren a continuació.

1.2.3.1 Sobre les propietats físiques

Les propietats físiques són aquelles relacionades amb la granulometria i organització espacial del sòl. Les propietats físiques que s'han vist millorades per l'aplicació d'oliassa són fonamentalment ocasionades per la càrrega orgànica. Així: s'afavoreix la formació i estabilitat d'agregats i per tant es redueix l'erosionabilitat (Hartmann et al., 1999), s'ha observat en sòls arenosos una disminució dels valors de la densitat aparent i augments en la porositat i la retenció d'aigua, sobretot a baixos pF, augmentant, per tant, la quantitat d'aigua útil pel vegetal, en estudis efectuats a Tunísia (Mellouli et al., 1998). L'aport d'oliassa millora, per tant, l'estructura i les propietats hidrodinàmiques del sòl, tot i que alguns autors alerten que la seva aplicació reiterada pot desplaçar el calci del sòl per potassi i sodi contribuint per tant a la desestructuració del sòl (Paredes et al., 1987).

La incorporació d'oliassa al sòl també modifica el color, tornant-lo més fosc (Paredes et al., 1987). El color del sòl però, és una propietat que intrínsecament no té quasi significació sobre el comportament del sòl, malgrat pugui afectar a l'absorció de calor i el balanç hídric del sòl.

L'aport de greix, oli residual de l'oliassa, pot impermeabilitzar superficialment el sòl i dificultar la circulació d'aigua d'infiltració, així com la difusió de gasos, afectant tant a la respiració dels organismes del sòl com a la respiració radicular.

1.2.3.2. Sobre les propietats fisico-químiques

Les propietats fisico-químiques del sòl són molt importants tant per la seva pròpia dinàmica com per al desenvolupament vegetal. Les propietats que es

veuen afectades per la incorporació d'oliassa al sòl són el pH, la salinitat i la capacitat d'intercanvi iònic. En relació al primer, tenint en compte l'acidesa del residu (pH 4) i la capacitat tampó del sòl, pot afavorir l'acidificació de determinats sòls àcids i neutres (Fiestas et al., 1982). A més, en ser l'oliassa una solució salina amb concentracions elevades de cations intercanviables (sobretot potassi), pot desplaçar els protons retinguts al complex de canvi afavorint-ne encara més l'acidificació. Quan s'aplica sobre sòls calcaris (cas més freqüent) l'oliassa queda neutralitzada ràpidament pels carbonats presents, de manera que no cal neutralitzar-la prèviament (Morisot 1979 i 1981; Fiestas et al., 1982). D'altres autors observen, en canvi, un augment temporal del pH del sòl (Sierra et al., 2000).

L'elevada salinitat del residu és un dels factors limitants de l'aplicació d'oliassa al sòl. Zucconi i Bukovac (1969) en desaconsellen l'ús degut a l'elevada càrrega contaminant i elevada pressió osmòtica causada per les sals. Della Monica et al. (1979 i 1980) i Potenz et al. (1980) en experiments realitzats en sòls calcaris a dosis d'aportació de $480 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ observen un increment de la fertilitat, però adverteixen de possibles efectes negatius deguts a l'increment de la conductivitat elèctrica.

L'aport d'oliassa també influeix positivament en la CIC o capacitat d'intercanvi catiónic (Paredes et al., 1987; Hartmann et al., 1999), donat que es tracta d'una propietat vinculada sobretot a fraccions col·loïdals com l'argila i la matèria orgànica. En aquest cas l'increment de la CIC s'atribueix a l'aport orgànic que proporciona l'oliassa.

1.2.3.3. Sobre les propietats químiques

L'aport d'oliassa al sòl incrementa (de forma important) el contingut de matèria orgànica d'aquest (Della Monica, 1978; Potenz et al., 1980; Torres et al., 1980 i 1988; Levi Minzi et al., 1992), però el fet de que es tracti de matèria orgànica poc madura (no estabilitzada) causa també un increment de l'activitat microbiana i un consum d'oxigen que pot causar anaerobiosi (Bernal et al., 1998) en cas de que no s'aïregi. A més, l'elevada relació C/N de l'oliassa fa que aquesta activitat microbiana immobilitzi inicialment el nitrogen soluble

del propi sòl. (Torres et al., 1980; Morisot i Tourier, 1986; Riffaldi et al., 1993; García Ortiz et al., 1995). Aquest darrer efecte és observat durant 4 a 6 setmanes fins i tot afegint una sal amoniacal i el contingut de nitrogen total també va disminuint amb el temps (Pérez i Gallardo Lara, 1987).

L'oliassa també aporta potassi, calci i magnesi. Segons Albi et al. (1960) l'oliassa pot emprar-se com a adob de tipus potàssic, donat que en conté aproximadament un 1% expressat en K_2O , i a dosis de $10 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ es suficient per assolir el nivell òptim de potassi en conreus de blat i moresc; aquesta dosi també la troba adequada Morisot (1979 i 1981). En estudis on se segueix l'evolució de diferents paràmetres després d'haver aplicat oliassa, s'observa que el contingut de potassi soluble no difereix amb el del sòl control (Levi Minzi et al., 1992) en canvi segons Riffaldi (1993) el potassi extret amb acetat amònic a pH 7 és manté en el temps molt superior al del control, això demostra que el potassi queda retingut en el complex de bescanvi, perllongant per tant l'efecte fertilitzant.

El calci i magnesi aportats per l'oliassa és molt inferior i per tant no suposa un enriquiment tant marcat com el de potassi. A més a més el potassi pot desplaçar el calci del complex de bescanvi (López et al., 1996) i pot induir a un descens del magnesi assimilable (Pérez et al., 1986a), aquest efecte s'anomena antagonisme iònic (Russell, 1973) en aquest cas del potassi sobre el magnesi.

El fòsfor també és present a l'oliassa en un 0,3% expressat com a P_2O_5 molt valoritzable com adob (Albi i Fiestas, 1960) i pot, juntament amb el potassi, substituir els adobs minerals. Quan s'aplica oliassa al sòl s'observa una disminució inicial de la quantitat d'alguns anions solubles entre ells el fòsfor, probablement degut a l'adsorció per part del col·loides del sòl o a la immobilització per part del calci o dels microorganismes del sòl. En aquest darrer cas, el fòsfor torna als valors inicials al cap d'uns vint dies després de l'aport del residu (Riffaldi et al., 1993).

Un dels principals inconvenients de l'aplicació d'oliassa al sòl és la possible acumulació de **compostos orgànics** amb certa toxicitat tant pels microorganismes del sòl com pels vegetals. Entre ells es diferencien els compostos hidrofòbics i els hidrosolubles. Quant als primers s'ha observat un

increment del contingut de **compostos hidrofòbics** totals (Riffaldi et al., 1993), es a dir, això indica que l'aport d'oliassa pot alterar la composició de la fracció lipídica. Mitjançant tècniques de cromatografia de gasos amb detector de masses (CG-MS) i piròlisi s'han detectat a concentracions superiors a les del sòl control d'àcids grassos com el: palmític, esteàric i sobre tot oleic, tant en la fracció soluble com en la fracció lligada als àcids húmics, on tenen tendència a acumular-se aquest tipus de substàncies (González-Vila et al., 1995).

Quant als **compostos hidrosolubles**, els més abundants, es poden diferenciar en funció de la biodegradabilitat. Els compostos ràpida de degradabilitat com ara els sucres, polialcohols i àcids orgànics presenten alhora escàs poder de penetració al sòl; en canvi els compostos més recalcitrants, com ara els polifenols i altres substàncies polimèriques tenen major poder de penetració (Ruiz, 1997). Alguns d'aquests compostos contenen grups actius que poden ser capaços de formar quelats amb diferents metalls i afavorir-ne la mobilització. Madrid i Díaz-Barrientos (1994 ab) i Cabrera et al. (1986) van demostrar que l'oliassa és capaç de complexar coure afegit en solució en quantitats de fins a 44 mg g⁻¹.

1.2.3.4. Sobre les propietats biològiques

Un dels efectes característics de l'oliassa és l'activitat antibacteriana (Martínez et al., 1986) i antifúngica (Tardioli et al., 1997) que manifesta. Malgrat això, en aplicar oliassa al sòl s'observa inicialment un intens increment de l'activitat respiratòria global, que es manté durant un temps (Flouri et al., 1990). S'ha observat que els sòls contaminats amb oliassa en general presenten major nombre de microorganismes (Paredes et al., 1987; Flouri et al., 1990; Ruiz, 1997) a excepció dels bacteris esporulats i els del gènere *Bacillus* (Paredes et al., 1986 i 1987) que han resultat ser els més sensibles en tests d'activitat antibacteriana (Martirani et al., 1996). Entre les poblacions microbianes que augmenten es troben els bacteris coryneformes (Paredes et al., 1986), bacteris nitrificants, acidòfils i desnitrificants (Paredes, et al., 1987), fet que pot explicar alguns fenòmens d'immobilització del nitrogen (Torres et al., 1980). També augmenten les poblacions microbianes de bacteris fixadors de nitrogen (Flouri et al., 1990; Ruiz, 1997) com *Azotobacter* (García et al., 1992), els

solubilitzadors de fòsfor (Paredes et al., 1987; Ruiz, 1997) i els bacteris degradadors de fenols i els fongs (Flouri et al., 1990).

L'oliassa no conté microorganismes patògens (Mouncif et al., 1993) per tant no existeix risc de transmissió de malalties a persones ni animals.

1.2.3.5. Efectes sobre els vegetals

García Rodríguez (1990) observa que aplicant oliassa durant 3 anys consecutius a dosis de 80, 160 i 360 m³ ha⁻¹, aporta el potassi, fòsfor i nitrogen necessaris per al conreu, amb produccions similars a les obtingudes a l'aplicació d'adobs minerals. Torres et al. (1980) observen un increment de la concentració de potassi en el teixit de blat que ha estat adobat amb oliassa i una disminució del contingut en calci i magnesi, atribuïble a la interacció potassi-calc-magnesi ja comentada anteriorment.

Un gran inconvenient de l'ús d'oliassa en els conreus és la marcada fitotoxicitat del residu, degut a l'elevada salinitat, que fa augmentar la pressió osmòtica de la solució del sòl dificultant per tant l'absorció d'aigua per les arrels. Per altra banda la càrrega orgànica de l'oliassa també té propietats fitotòxiques, que s'atribueixen a la presència de compostos fenòlics capaços de provocar la inhibició de la germinació de llavors (Pérez et al., 1986b; Capasso et al., 1992) i possible fitotoxicitat sobre les arrels superficials. S'ha demostrat que la presència de combinacions de diferents compostos fenòlics tenen un efecte alelopàtic sinèrgic (Blum et al., 1997).

Segons Morisot (1979 i 1981) l'aplicació d'oliassa sobre conreus herbacis influeix negativament en el rendiment quan s'apliquen dosis superiors als 200 m³ ha⁻¹. La fitotoxicitat observada en aplicar oliassa al sòl és elevada al principi i disminueix lentament amb el temps a mesura que ho fa també la concentració de compostos fenòlics (Flouri et al., 1990; Levi Minzi et al., 1992; Riffaldi et al., 1993) per la qual cosa s'aconsella deixar un període entre l'aplicació d'oliassa i la sembra que oscil·la entre 20 i 150 dies segons la dosi, tipus d'oliasses, climatologia, tipus de sòl, etc.

1.3. ORIGEN I DINÀMICA DELS COMPOSTOS FENÒLICS AL SÒL

1.3.1. Origen i efectes

El sòl és un sistema trifàsic, format per les fases sòlida, líquida i gasosa, és dinàmic i molt complex. Les tres fases es troben interrelacionades entre sí, de manera que la organització tridimensional de la fase sòlida, determina la quantitat d'espai porós destinat a l'aigua i l'aire. La fracció sòlida està formada per nombrosos materials orgànics i inorgànics. Concretament la fracció orgànica està constituïda per la matèria orgànica i els organismes del sòl. A més, aquests darrers són els màxims responsables dels processos de transformació dels materials orgànics del sòl (mineralització i humificació). La matèria orgànica té una composició variable i molt complexa, fins i tot avui en dia encara no se n'ha esbrinat l'estructura exacta. La solució del sòl, principal font de nutrició del vegetal i de transport de components del sòl cap a altres matrius, conté nombroses sals i compostos orgànics dissolts. La composició de la solució depèn del tipus i característiques del sòl, condicions ambientals, tipus de vegetació, estació de l'any, de l'aplicació de residus etc. En nombrosos estudis s'ha observat que els lixiviats obtinguts del sòl tant en aigua com en extractants més agressius, contenen compostos fitotòxics atribuïbles sobre tot a compostos orgànics de pes molecular baix (inferior a 1.000) entre els quals hi destaquen els àcids carboxílics alifàtics, àcids fenòlics, aldehids i d'altres compostos encara no identificats (Stenn et al., 1994).

Els compostos fenòlics es poden classificar en dos grans grups: els fenols monomèrics, com per exemple els àcids benzoic i cinnàmic i els compostos polifenòlics (de major pes molecular) com ara tannins, flavonoides, àcids húmics i fúlvics.

La presència d'aquests compostos al sòl ve influïda pel tipus de vegetació (Whitehead et al., 1982), per les condicions ambientals (per exemple l'època de l'any) i pel contingut de carboni del sòl (Kuiters et al., 1987). Fonamentalment provenen de:

- Residus vegetals, concretament de la degradació de la lignina per part dels microorganismes del sòl que alliberen aldehids i àcids fenòlics (Flaig, 1964).
- Processos de síntesi per part dels microorganismes del sòl a partir de fonts de carboni no ligninià, com la cel·lulosa (Stevenson, 1982).
- Substàncies segregades pels vegetals i les llavors en període de germinació, com ara àcids fenòlics i derivats, catequines, flavones i flavonones (Bekara et al., 1998).
- L'aportació de residus rics en fenols com ara residus d'almàsseres (oliassa, pinyolada i pinyolassa), vinasses etc., que contenen tant fenols lliures com polimeritzats (Ohno et al., 2000).
- L'aportació de residus industrials pot incorporar compostos fenòlics sintètics com ara clorfenols, cresols etc., que són compostos totalment estranys pel sòl (Sample et al., 2001).

Als **fenols monomèrics** se'ls relaciona amb els fenòmens d'allelopatia (Mc Calla i Haskins, 1964; Mc Pherson et al., 1971; Lokhi, 1976; Jalal i Read 1983; Siqueira et al., 1991). Poden interferir en l'assimilació del potassi i del fòsfor (Glass 1973), en la inhibició de la nitrificació (Rice i Pancholy, 1974) i en la translocació de metalls en processos de podzolització (Vance et al., 1986; Norberg et al., 1993). I als **compostos polifenòlics**, se'ls atribueixen fenòmens d'inhibició de la descomposició de materials orgànics (Northup et al., 1995) gràcies a la capacitat de formar complexos insolubles amb proteïnes i per tant poden inactivar enzims implicats en processos de descomposició, com per exemple la fosfatasa àcida del sòl (Rao et al., 1998). Poden també complexar-se amb substàncies que contenen nitrogen orgànic, causant la immobilització de nitrogen del sòl (Mole i Waterman, 1987). Tots ells a més, juguen un paper molt important en la formació de l'humus del sòl (Flaig et al., 1975; Stevenson, 1982).

En general, existeix un equilibri dinàmic entre la incorporació al sòl de compostos aromàtics, tant polimèrics com compostos de baix pes molecular, i

la degradació per part dels microorganismes. En algunes ocasions, com en el cas de l'aport d'oliassa, es pot trencar l'equilibri com a conseqüència d'un aport massiu, fent que els microorganismes no puguin respondre adequadament a aquesta acumulació.

1.3.2. Dinàmica

Quan un compost entra en contacte amb el sòl es poden desencadenar una sèrie de processos químics, físics i biològics que condicionaran l'evolució d'aquests i que depenen fonamentalment de les característiques del contaminant, del sòl i de les condicions ambientals. Els processos en el sòl es poden classificar en processos de transformació i de distribució.

1.3.2.1. Processos de transformació

Els processos de transformació poden canviar la naturalesa o l'estructura del contaminant, modificant la seva toxicitat (detoxificació, transtoxificació, toxificació) i alhora la mobilitat, entre moltes altres propietats. Les reaccions més freqüents que poden patir els contaminants i més concretament els fenols són: la complexació, la hidròlisi, els equilibris àcid-base, l'oxidació-reducció, la biotransformació i la polimerització. A més, aquestes reaccions poden ser catalitzades per la llum solar (transformació fotoquímica) i en alguns casos conduir a una degradació (fotodegradació) dels compostos fenòlics.

1.3.2.1.1. Complexació

Aquest procés consisteix en la formació d'un complex estable entre un ió metàl·lic, generalment de transició, i un lligand que pot ser inorgànic (aigua, NH_3 , Cl^- , CN^- , etc.) o orgànic, en el darrer cas es formen complexos organometàl·lics. Els lligands orgànics poden ser molt variats (alcohols, aldehids, cetones, amines, hidrocarburs aromàtics, èsters, etc.) i entre ells es troben els fenols que són agents amb elevada capacitat complexant (Kuiters et al., 1987; Mench et al., 1988). Concretament els o-difenols com l'àcid protocatèquic formen quelats solubles amb ferro i alumini que poden intervenir en la formació d'horitzons espòdics (Vance et al., 1985 i 1986; Beggaren i Mulder, 1995). D'altra banda els monòmers que contenen catecol

poden formar complexos amb coure (Oess et al., 1997) i l'aplicació d'oliassa a un sòl contaminat amb diferents elements potencialment tòxics, afavoreix la mobilització d'alguns d'aquests elements com el plom (Bejarano i Madrid, 1992.; Madrid i Diaz-Barrientos, 1994 ab).

1.3.2.1.2. Reaccions d'hidròlisi

Les reaccions d'hidròlisi succeeixen quan un compost reacciona químicament amb l'aigua per formar un nou compost. Aquestes reaccions depenen fonamentalment de la naturalesa del compost i del pH del medi. Els fenols i àcids carboxílics en general són resistents a la hidròlisi (taula 1.3.1).

Taula 1.3.1. Susceptibilitat d'alguns grups funcionals orgànics a partir reaccions d'hidròlisi (Boulding, 1995).

Fàcilment hidrolitzables	Difícilment hidrolitzables
Amides, amines, carbamats, nitrils, epòxids, èsters carboxílics i èsters dels àcids fosfònic, fosfòric, sulfònic i sulfúric.	Alcans, alquens, alquins, benzens, bifenils, hidrocarburs aromàtics policíclics i heterocíclics, aromàtics halogenats, PCBs, aromàtics nitrats, amines aromàtiques, alcohols, fenols , glicols, èters, aldehids, cetones, àcids carboxílics i sulfònics.

1.3.2.1.3. Equilibris àcid-base

Les reaccions d'equilibri àcid-base afecten al pH o la concentració d'hidrogenions en la solució. Els compostos fenòlics i en especial els àcids fenòlics simples es comporten com a àcids dèbils amb pKa al voltant de 4,5-4,7, això fa que en sòls lleugerament àcids, neutres i bàsics els grups àcids o fenòlics es trobin ionitzats.

1.3.2.1.4. Oxidació-reducció

Els processos redox són dels fenòmens més importants que intervenen en la dinàmica dels contaminants al sòl. Les reaccions redox impliquen la pèrdua d'electrons i l'increment del número d'oxidació d'una substància o sistema (oxidació), alhora que una altra substància o sistema guanya electrons i per tant es redueix el número d'oxidació (reducció). Aquestes transformacions es

regeixen per la equació de Nernst i són reversibles. És un procés que pot esdevenir tant per via biòtica com abiòtica i el sentit de les reaccions implicades entre les formes oxidades i reduïdes depèn del potencial redox de les espècies participants en la reacció (E_0), del potencial redox del sòl (E_h) i del pH del medi. En el sòl el potencial redox està condicionat pel grau d'humitat o hidromorfia i en casos d'excés d'aigua poden esdevenir fenòmens de reducció.

Els compostos fenòlics són susceptibles de ser oxidats (taula 1.3.2). Els més reactius són els o-difenols i trifenols que ràpidament s'autooxiden per formar polímers a pH majors de 6 (Haider et al., 1976). El Fe^{3+} present tant en la solució del sòl com en la fase mineral (en forma de ferhidrita) pot oxidar abiòticament fins a CO_2 als o-difenols i metoxifenols (Pracht et al., 2001) i els òxids de Mn^{4+} són oxidants efectius enfront la hidroquinona a pH entre 4 i 8 (Shindo i Huang, 1982).

Taula 1.3.2. Susceptibilitat d'alguns grups funcionals orgànics a patir reaccions d'oxidació (Boulding, 1995).

Fàcilment oxidables	Difícilment oxidables
Amines aromàtiques, olefines, fenols , diens, alquil sulfides, enamines	Alquens, haloalcans, alcohols, èsters, cetones.

La presència d'enzims (peroxidases, fenoloxidas) al sòl, procedents de bacteris, fongs i plantes, poden també oxidar els fenols presents en la solució del sòl (Durán i Espósito, 2000; Perucci et al., 2000).

Els fenols poden reaccionar tant amb compostos orgànics com amb inorgànics del sòl (Dalton, 1989; Kung i Bridge, 1989).

Els fenols són altament reactius en el procés de cloració d'aigües (potabilització) poden donar lloc a clorfenols, característics per la seva elevada toxicitat (Conrad i Huck, 1996; Kim et al., 1997).

1.3.2.1.5. Fotodegradació

Les reaccions fotoquímiques que impliquen l'acció de la llum solar com a catalitzador són molt importants en la degradació de compostos orgànics, sobretot en medis atmosfèrics i aquàtics. Pel que fa al sòl aquest procés només té relativa importància en els primers mil·límetres superficials i en zones amb gran insolació on d'altres processos poden ser poc importants. Les reaccions més comunes són l'oxidació i la hidròlisi fotoquímica tant per acció directa de la llum com per l'acció de substàncies fotosensibilitzants (ozó, compostos húmics, metalls, etc.). Els compostos fenòlics de les oliasses són susceptibles a ser fotodegradats en presència d'agents fotosensibilitzants (Amat et al., 1999; Miranda et al., 2001ab).

1.3.2.1.6. Biotransformació

És sense cap mena de dubte el procés més rellevant que pot causar la degradació de compostos orgànics gràcies a l'activitat biològica del sòl, que esdevé sobretot als horitzons superficials, encara que en menor mesura també es pot donar a la zona saturada (hidromorfa).

Els organismes del sòl que intervenen majoritàriament en aquest procés, són els microorganismes (bacteris, actinomicets, fongs, algues, protozous), encara que les plantes i altres organismes també hi poden jugar un paper significatiu. La transformació normalment dona (no sempre) metabòlits menys tòxics. Les transformacions biòtiques principalment implicades són la hidròlisi, hidroxilació, deshalogenació, desmetilació, metilació, nitro-reducció, desaminació, formació d'èsters, amidació i conjugació (Alexander, 1994). Aquestes transformacions poden mineralitzar el contaminant, es a dir transformar-lo en els productes inorgànics més simples (CO_2 , NH_4^+ , SO_2) o transformar-lo parcialment.

La degradació biològica pot ser fruit del metabolisme (si els microorganismes usen el contaminant com a font de carboni) o cometabolisme (si no l'usen). Es pot donar en presència d'oxigen, sent un procés aeròbic (és el cas de la majoria de sòls), o en absència, es parla aleshores d'un procés anaeròbic.

Els microorganismes del sòl poden degradar gran varietat de contaminants gràcies a la síntesi d'enzims específics. La producció d'aquests es controla genèticament i poden patir mutacions per adaptar-se a nous contaminants.

La presència de compostos aromàtics al sòl és un fet natural. La lignina (xarxa tridimensional de fenols unida a cel·lulosa), les substàncies húmiques (difícils de degradar), els segretats vegetals, i els compostos sintetitzats per microorganismes, són una font de matèria aromàtica i per tant els microorganismes del sòl (donat l'elevat nombre i varietat) estan adaptats a la presència d'aquests compostos i, per tant, són capaços de degradar-los. Alguns estudis han demostrat que els fenols, cresols i derivats metoxilats, poden ser usats com a font de carboni per diferents soques de bacteris, llevats i fongs extrems de sòls (Varga et al., 1970). Les lignines per exemple poden ser degradades per fongs ligninolítics (Kuwahara, 1981).

La principal dificultat que presenten els compostos aromàtics per a ser degradats és la ruptura de l'anell aromàtic donat que té una elevada energia de ressonància negativa i els dona una gran estabilitat termodinàmica (Gibson i Subramanian, 1984). L'estabilitat de l'anell també ve determinada per la naturalesa dels substituents (per exemple l'halogenació en dificulta la biodegradabilitat) i la posició dels diferents grups funcionals.

El primer pas per a l'obertura de l'anell aromàtic és la introducció de radicals hidroxil per a desestabilitzar l'anell, normalment per la presència d'enzims (oxigenases i dioxigenases). Els **fenols monomèrics** més comuns són oxidats aeròbicament mitjançant la introducció de radicals hidroxil fins a la formació de catecol, hidroquinona o àcid protocatèquic, que són els últims intermediaris abans de l'obertura de l'anell aromàtic (Barz i Weltring, 1985). Alguns exemples de precursors són l'àcid p-hidroxibenzoic que s'hidroxila per l'acció de fongs donant lloc a àcid protocatèquic (Crawford, 1981) i l'àcid vainílic es desmetila gràcies a fongs de la podridura blanca i marró donant lloc al mateix àcid (Alexander, 1977). Un cop hidroxilat l'anell, aquest es pot trencar per diferents rutes metabòliques: ruta "orto" o intradiol, "meta" i la del "gentisat" (Martin et al., 1994). Un cop trencat es formen àcids i aldehids (piruvat, fumarat, succinat, acetaldehid, etc.) que són incorporats al cicle de

Krebs per a la obtenció d'energia. Els fenols poden donar lloc a àcids alifàtics per acció dels microorganismes (Martin, 1976).

D'altra banda els **compostos fenòlics polimèrics** "a priori" són més recalcitrants, com la lignina i les substàncies húmiques, però aquest fet no impedeix que es degradin prèvia despolimerització, per microorganismes, especialment per fongs que intervenen en la degradació de la lignina (Kuwahara, 1981) i bacteris amb activitat fenoloxidasa (García-Pareja et al., 1987). Alguns fongs ericoides tenen l'habilitat per degradar fenols polimeritzats, com ara els tanins, i accedir al nitrogen contingut als polímers fenol-nitrogen (Bending i Read, 1996).

1.3.2.1.7. Polimerització

La polimerització és el procés pel qual es formen molècules de gran pes molecular (polímers) a partir de la unió d'altres de petites. Aquest procés va molt lligat a fenòmens tant biòtics com abiòtics i amb la formació de la matèria humificada del sòl.

Els compostos fenòlics en presència d'oxidants, generen fenoxi-radicals que reaccionen amb facilitat amb els materials húmics. La polimerització oxidativa dels fenols és un procés important en la formació dels compostos húmics, sobretot amb substàncies que contenen grups amino lliures (Kononova, 1966; Stevenson, 1982). Aquesta polimerització es causada gràcies a la presència d'enzims com les peroxidases, tirosinases, fenolases, lacases, etc. (Sjoblad i Bollag, 1981) i catalitzadors inorgànics com per exemple el MnO_2 (Huang et al., 1997; Naidja et al., 1998) donant lloc a la formació d'esquelets polimèrics estables.

La humificació és un procés natural, que consisteix en convertir els materials orgànics en un policondensat poc reactiu. Termodinàmicament es minimitza l'energia lliure i es degrada molt lentament, alliberant productes sense toxicitat. Per tant, la incorporació de xenobiòtics als materials húmics, és un procés de detoxificació natural a tenir en compte (Verstraete i Top, 1999).

Els polifenols poden formar complexos tant amb substàncies que contenen nitrogen (aminoàcids, pèptids, àcids nucleics, etc.) com amb cel·luloses, pectines i lípids que no en contenen (Mole i Waterman, 1987).

Per tant, els compostos fenòlics aportats per l'oliassa "a priori" podran ser incorporats a la matèria orgànica humificada del sòl.

1.3.2.2. Processos de distribució

Els processos de distribució afecten a la forma o estat d'associació entre un compost i la fase aquosa o sòlida del sòl en un determinat temps i unes condicions ambientals determinades. En general no afecten les propietats tòxiques del contaminant, en canvi la mobilitat es veu afectada. Entre ells es troben: la precipitació-dissolució, sorció i volatilització.

1.3.2.2.1. Precipitació-dissolució

La precipitació és un procés de distribució de fases on es forma un sòlid insoluble i se separa de la solució. La precipitació per tant, redueix la mobilitat dels contaminants, sempre i quan les condicions mediambientals futures continuïn sent prou estables. La solubilitat depèn principalment del producte de solubilitat del contaminant, de la temperatura, pressió i condicions de pH.

Per contaminants orgànics la precipitació no acostuma a ser un procés massa rellevant, tot i que de vegades en presència de cations de calci, magnesi, ferro i alumini, alguns compostos orgànics precipiten com ara els policlorfenols i el pentaclorfenol a pH inferior a 5 (Choi i Aomine, 1974). La solubilitat dels fenols naturals augmenta quan es formen sals de sodi i calci (Whitehead et al., 1981).

1.3.2.2.2. Sorció

La sorció és el procés pel qual compostos presents a la fase aquosa són transferits a la fase sòlida. Aquest procés és un dels que més afecta la mobilitat, i també en menor grau la persistència, biodegradabilitat, lixiviació i volatilitat dels contaminants (Pierzynski, et al., 1994).

La sorció depèn (Sposito, 1984) fonamentalment del tipus i naturalesa del contaminant, de la naturalesa de la fase sòlida del sòl (principalment de la matèria orgànica, argiles, òxids de ferro i alumini, materials de naturalesa amorfa) i de les condicions ambientals (pH, salinitat, etc.).

Les reaccions de sorció acostumen a ser exotèrmiques i es poden classificar en dos grups en funció de l'energia implicada (Boulding, 1995). La **sorcio química**, d'alta energia ($>10 \text{ kcal mol}^{-1}$) implica la formació de lligams químics entre l'adsorbat i la superfície de l'adsorbent, i entre ells hi ha la sorció iònica, responsable de l'intercanvi iònic, sent més intens el catiònic (que augmenta en fer-ho el pH) que l'aniònic (causat per òxids i hidròxids metàl·lics), donat que als col·loides del sòl hi predominen les càrregues negatives (argiles, matèria orgànica). També cal considerar els ponts d'hidrogen i els enllaços covalents. La **sorcio física**, de baixa energia, és originada per forces de Van der Waals, que són forces electrostàtiques dèbils, i l'atracció hidrofòbica.

La sorció pot ser reversible (adsorcio i desorcio) com a conseqüència del decreixement de la força iònica de la solució dels sòl o per desplaçament per competència d'ions; o contràriament pot ser irreversible per la formació de complexos organometàl·lics o associacions covalents amb la superfície de la fracció sòlida del sòl. La capacitat d'adsorcio pot determinar-se mitjançant isoterms d'adsorcio, essent les més emprades les equacions de Freundlich i Langmuir.

Els fenols un cop incorporats al sòl, gràcies a l'elevada reactivitat enfront la matriu organo-mineral, són instantàniament adsorbits (Huang et al., 1977) i en menor mesura els dos primers dies (Dalton et al., 1989), per tant, el contingut de fenols a la solució del sòl acostuma a ser baix (Whitehead et al.,

1982; Sposito, 1984). Aquesta adsorció tant sobre partícules orgàniques com inorgàniques pot ser reversible i per tant desorbir-se i tornar a la solució del sòl (Kaminsky i Muller, 1977). En aquest cas les forces implicades són de Van der Waals o per ponts d'hidrogen (Allison, 1973) i la reversibilitat pot ser deguda al desplaçament per un altre compost capaç d'establir un pont més fort o per la llei d'acció de masses que afavoreix l'establiment de ponts d'hidrogen per part de l'aigua (Greenland et al., 1970).

El fet que els compostos fenòlics al pH habitual del sòl (per sobre de 5), es trobin ionitzats, fa que siguin fàcilment adsorbits pels òxids i hidròxids de ferro i alumini que es troben carregats positivament (Huang et al., 1977). S'ha observat per exemple per espectrometria d'infraroig (IR) que el 4-hidroxibenzoat s'uneix als òxids de ferro formant un complex de coordinació d'esfera interna (Kung i McBride, 1989); aquestes unions són molt estables degut a l'enllaç covalent format entre el metall i l'oxigen estructural, donador d'electrons (Stumm, 1992).

Els compostos fenòlics també es poden unir a càrregues negatives (argiles i matèria orgànica) mitjançant ponts de cations intercanviables polivalents (unió reversible) o cations no intercanviables (unió no reversible) com ara el Mn (Lehmann et al., 1987). En experiments realitzats amb àcid ferúlic, s'observà que l'adsorció a través de ponts amb cations polivalents d'aquest fenol esdevenia fonamentalment amb cations no intercanviables (Dalton et al., 1987). L'adsorció d'aquests compostos també es dona en argiles (caolinita, ilita i vermiculita) encara que en menor grau (Huang et al., 1977).

Cal destacar que els fenols tenen molta afinitat per lligar-se a la matèria orgànica sobretot en horitzons tipus A (Dalton et al., 1989). Aquesta unió pot ser reversible o poden quedar incorporats irreversiblement a la matèria orgànica humificada formant part de la mateixa, donat que aquesta està formada per polímers amb unitats bàsiques aromàtiques molt similars als compostos fenòlics naturals (Haider et al., 1977). La matèria orgànica del sòl és la fracció que intervé més àctivament en la retenció irreversible dels fenols, i en general la recuperació per extracció d'aquests tipus de compostos és inversament proporcional al contingut de matèria orgànica del sòl.

Els fenols també es poden adsorbir a la matèria orgànica dissolta (Huber et al., 1992; Klaus et al., 1998) de manera que també es veu afectada tant la distribució com el transport d'aquests compostos (Ohlenbusch et al., 2000). També poden lligar-se a polisacàrids (Harley i Jones, 1977).

Els compostos fenòlics amb substituents metoxi i cadenes laterals amb grups àcids són més susceptibles de ser adsorbits al sòl (Dalton et al., 1989).

L'adsorció de contaminants orgànics mitjançant enllaços o unions covalents afecta a la distribució del contaminant en el medi sòl-aigua i a més pot provocar la disminució de la seva toxicitat envers els microorganismes i plantes. Però al mateix temps es redueix la biodegradabilitat (Alexander, 1994) i s'evita el moviment dels contaminants dins i fora el sòl i per tant la contaminació d'aigües continentals.

1.3.2.2.3. Volatilització

La transferència de contaminants de la fase aquosa o sòlida a l'atmosfera s'anomena volatilització. No és un procés majoritari en sòls, però pot ser relativament important per contaminants com ara solvents o derivats del petroli. Els factors que afecten a la volatilització són principalment la pressió de vapor del contaminant (si està per sobre de 10 mm Hg a 20°C hi ha volatilització), de la temperatura, de l'àrea de contacte entre el contaminant i la zona insaturada, i de les característiques i condicions del sòl (Boulding, 1995).

Quant a l'oliassa, donat que conté àcids volàtils (àcid acètic, etc.) aquests seran susceptibles de passar a l'atmosfera per volatilització. D'altra banda els compostos fenòlics són relativament poc volàtils i per tant poden passar a la fase gasosa només en baixes concentracions (Rana et al., 2003).

~~3.0.0.0.0.~~

1.4. ANÀLISI DE COMPOSTOS FENÒLICS EN SÒLS

L'anàlisi de qualsevol component químic o contaminant del sòl consta de dues etapes; l'extracció i la *quantificació*. La primera és una etapa específica de l'anàlisi de sòls. En aquesta etapa s'utilitza un extractant químic per a treure el contaminant de la matriu sòl, un cop extret es procedeix a la quantificació, que consisteix en mesurar la quantitat de compost que s'ha solubilitzat a l'extractant. Aquesta mesura no és exclusiva de l'anàlisi de sòls, qualsevol bon mètode quantitatiu és vàlid.

El tipus d'extractant que s'esculli és decisiu per a conèixer l'estat del contaminant, la quantitat, el potencial tòxic per a l'home, plantes i animals, així com la mobilitat.

1.4.1. Extracció

L'extracció és pot realitzar des d'un punt de vista **estructural o de distribució** en el que es pretén és saber en quina fase del sòl es troba el contaminant, com per exemple en la solució, adsorbit a argiles, etc., o des d'un punt de vista **funcional** amb la intenció de tenir informació sobre la mobilitat del contaminant, com per exemple la quantitat de contaminant que poden assimilar els vegetals o que pot contaminar les aigües subterrànies. En aquests darrers, l'extractant escollit simula algunes de les situacions que poden tenir lloc en condicions ambientals, com per exemple l'efecte de la pluja. De totes maneres no deixa de ser una anàlisi que descriu una situació estàtica, i en condicions reals el procés és dinàmic i depèn de molts més factors (climatologia, microflora, accions externes, etc.). Això fa que l'extractant ideal que descriu totes les situacions reals no s'hagi trobat i calgui escollir un extractant que descriu el comportament en una situació estàndard.

La relació extractant:sòl, el temps de contacte i les condicions d'extracció (temperatura, pressió, etc.) són factors que també influeixen clarament en el rendiment de l'extracció.

1.4.1.1. En relació a l'estructura o la distribució

Des del punt de vista estructural o de distribució els compostos fenòlics poden estar tal i com s'indica en l'apartat número 1.3.2: a la solució del sòl; units a la fase sòlida per forces de Van der Waals, per interaccions electrostàtiques o ponts d'hidrogen; adsorbits a argiles o matèria orgànica mitjançant ponts amb cations polivalents; adsorbits als òxids i hidròxids de ferro o alumini i polimeritzats amb la matèria orgànica.

En la taula 1.4.1 es detallen alguns dels extractants més emprats per l'anàlisi de fenols naturals, així com sobre el compartiment sobre el que actuen i el mecanisme d'extracció. Els extractants més usuals són de base aquosa, així doncs si l'extractant utilitzat és l'**aigua** s'extraurà la fracció soluble del sòl. Si s'usen **solucions salines** s'afavorirà alliberament dels fenols units a cations intercanviables per intercanvi catiònic o units als òxids o hidròxids de ferro o alumini de forma reversible per intercanvi aniònic. En afegir agents **complexants** s'alliberaran a més els units mitjançant cations no intercanviables i si es treballa en medi bàsic es poden trencar els enllaços covalents amb la matèria orgànica (Whitehead et al., 1981). En general, en augmentar el pH de l'extractant s'obtenen millors rendiments en l'extracció, degut a la hidròlisi de la matèria orgànica. No s'ha d'oblidar que els compostos húmics són una font de compostos fenòlics, i si l'extracció es realitza en presència d'oxigen, pot donar lloc a la formació d'artefactes de productes que poden interferir en la posterior quantificació dels fenols. En menor mesura també s'utilitzen mescles d'**aigua amb metanol** o **dissolvents orgànics** quelcom menys polars per alliberar als fenols retinguts per unions hidrofòbiques.

Taula 1.4.1. Llistat d'extractants emprats per diversos autors per a l'extracció de fenols del sòl i mecanisme d'acció.

Extractant	Mecanisme principal	Tipus d'unió o fase on actua	Referències bibliogràfiques
Sense extractant afegit	Separació sense succió (lixiviació i centrifugació)	Solució del sòl: aigua capil·lar i gravitacional	Gallet i Keller, 1999
Aigua	Llei d'acció de masses. Interaccions moleculars.	Solució del sòl. Forces Van der Waals, forces electrostàtiques, ponts d'hidrogen	Greenland, 1970; Kaminsky i Muller, 1977;; Dalton et al., 1987; Kuiters i Denneman, 1987; Levi Minzi et al., 1992; Riffaldi

Introducció

			et al., 1992; Lowe, 1993; Steen et al., 1994; Ohno i First, 1998;
Aigua calenta (121°C)	Llei d'acció de masses. Interaccions moleculars més intenses.	Solució del sòl Forces V. der Waals, forces electrostàtiques, ponts d'hidrogen	Blum et al., 1991 i 1992
Na ₂ CO ₃ (pH 11)	Intercanvi catiónic i aniònic. Hidròlisi.	Ponts amb cations intercanviables (m.orgànica o argiles), unions amb òxids i hidròxids de Fe i Al	Wang et al., 1967
Acetat sòdic 0,5M	Intercanvi catiónic i aniònic	Ponts amb cations intercanviables (m.orgànica o argiles), unions amb òxids i hidròxids de Fe i Al	Dalton et al., 1987
EDTA 0,5N	Complexació	Ponts amb cations intercanviables i no pesants (m.orgànica o argiles)	Dalton et al., 1987
DTPA 0,05 / 0,5N	Complexació	Ponts amb cations intercanviables i no pesants. (m.orgànica o argiles)	Dalton et al., 1987
EDTA-Na ₂ 0,03M/0,05N/0,5M	Complexació i intercanvi catiónic.	Ponts amb cations intercanviables i no (m.orgànica o argiles)	Kaminsky i Muller, 1977 Blum et al., 1994
DTPA 0,005M+CaCl ₂ 0,01M pH 7,3	Complexació i intercanvi catiónic	Ponts amb cations intercanviables i no de tot tipus (m.orgànica o argiles)	Lindsay i Norvell, 1978
NaOH 2N en atmosfera inert (N ₂)	Hidròlisi bàsica forta	Unions amb la matèria orgànica humificada Unions a polisacàrids	Guenzi i McCalla, 1966 Tuner i Rice, 1975 Katase, 1981b, Whitehead et al., 1981 Dalton et al., 1987
NaOH 0,5N	Hidròlisi bàsica lleu	Unions amb la matèria orgànica humificada Unions a polisacàrids	Vance et al., 1985
Pirofosfat sòdic 0,1M pH10	Complexació de coordinació, intercanvi catiónic i hidròlisi.	Ponts amb alumini, ferro i calci	Vance et al., 1986
Pirofosfat sòdic 0,1M pH 7	Complexació de coordinació Solubilitza minerals cristal·litzats	Ponts amb alumini, ferro i calci Unions a òxids de ferro i alumini irreversibles. Ataca l'estructura mineral d'òxids i hidròxids de Fe i Al.	Vance et al., 1985
Aigua + CaOH pH10	Hidròlisi bàsica lleu	Unions dèbils sobre l'humus	Kuiters i Denneman, 1987
Citrat sòdic 0,25M pH 7	Complexació	Ponts amb cations intercanviables i no (m.orgànica o argiles)	Blum, 1997
Ac.citric/citrat 0,25M + KCl 0,01M pH7	Complexació i intercanvi catiónic	Ponts amb cations intercanviables i no (m.orgànica o argiles)	Blum, 1997
NaOH 2,5N+ CuO+Fe ²⁺ 170° C	Hidròlisi bàsica i oxidació lleu	Allibera fenols simples i lípids de la lignina i dels compostos húmics	Kögel i Botcher, 1985 Lehtonen et al., 2001
Nitrobenzè + NaOH	Hidròlisi bàsica i oxidació lleu	Allibera fenols de la matèria orgànica	Morrison, 1958 i 1963
Ac.acètic 0,2M + NH ₄ NO ₃	Intercanvi catiónic i aniònic.	Ponts amb cations intercanviables + no	Dalton et al., 1989

0,25M+ NH ₄ F 0,015 M+ HNO ₃ 0,13M+ EDTA 0,001M	Complexació	intercanv. (m.orgànica o argiles)	
HCl 2N	Hidròlisi àcida	Actua sobre glicòsids	Guenzi i McCalla 1966
Amberlita+ clorur sòdic	Absorció hidrofòbica a la reïna.	Unions hidrofòbiques	Young et al., 1984
Metanol+ aigua	Dissolvent orgànic mixt molt polar	Solució sòl i unions hidrofòbiques	Constantinides i Fownes, 1994
Metanol	Dissolvent orgànic polar	Unions hidrofòbiques	Guenzi i McCalla, 1966 Caballeira i Cuervo, 1980 Dalton et al.,1987
Acetona	Dissolvent orgànic poc polar	Unions hidrofòbiques	Guenzi i McCalla, 1966
Clorur metilè +acetona o hexà	Dissolvent orgànic molt poc polar	Unions hidrofòbiques	Mètode EPA 3550, 1986

4.1.1.2. En relació a la funcionalitat

Des del punt de vista funcional, el que es pretén és conèixer la fracció de contaminant que és susceptible de ser assimilat pels vegetals, que pot afectar a la microflora del sòl o mobilitzar-se cap a d'altres medis, principalment a les aigües continentals. Com ja s'ha comentat anteriorment els fenols poden trobar-se a la solució del sòl o bé sorbits reversible o irreversiblement. Els fenols en solució, per tant en estat "lliure", són els que poden provocar efectes sobre l'activitat microbiana, interferir en el creixement vegetal i poden mobilitzar-se cap a horitzons inferiors o a les aigües continentals. Quant als fenols sorbits, únicament aquells sorbits dèbilment (adsorció reversible) poden tornar a passar a la solució del sòl en cas que es modifiquin les condicions ambientals (temperatura, humitat, pH, salinitat, etc.) o per intercanvi iònic entre les arrels i la fase sòlida del sòl.

Un dels reptes en l'anàlisi de fenols del sòl és extreure aquells que són o seran biodisponibles a llarg termini. L'ús d'extractants massa agressius poden alliberar fenols (per exemple els adsorbits irreversiblement a la matèria orgànica) que en condicions ambientals habituals no serien mai biodisponibles.

L'extractant que més s'aproxima a les condicions naturals és l'**aigua** i a la vegada és el més emprat en estudis de fitotoxicitat, efectes sobre l'activitat microbiana i per avaluar la fracció susceptible de mobilitzar-se cap a les

aigües continentals. Alguns autors (Kaminsky i Muller, 1978) arriben a la conclusió que l'ús d'**extractants alcalins** és inadequat per a estudis de fitotoxicitat, donat que poden modificar-se els fenols i extraure'n molts més dels que es poden desorbir de forma natural. Altres autors (Dalton et al., 1987; Blum, 1997) justifiquen l'ús d'agents **complexants** tipus EDTA o citrat perquè els microorganismes del sòl poden alliberar diferents compostos (àcids acètic, cítric, làctic, glicòlic, galacturònic, etc.) capaços de complexar cations. L'ús de pirofosfat sòdic ha resultat molt útil per a l'estudi dels compostos fenòlics implicats en processos de podzolització (Vance et al., 1985).

Segons Young et al. (1984) l'extracció amb **dissolvents orgànics** per a estudiar fenòmens de fitotoxicitat per compostos d'origen natural s'ha d'obviar, donat que els dissolvents orgànics extreuen a més constituents dels microorganismes i residus orgànics no descomposats. Els dissolvents orgànics s'empren més per a l'extracció de fenols sintètics que en general són més hidrofòbics.

Per tant, és necessari escollir l'extractant més apropiat a la fracció de fenols que interessa estudiar, i en molts casos es fa necessari l'ús de diferents extractants en anàlisis separades o extraccions successives, per tal d'aconseguir la fracció de contaminant desitjada.

Actualment s'estan utilitzant noves tècniques de **microextracció en fase sòlida** (SPME), que no requereixen l'ús de reactius d'extracció, no es modifica pràcticament la mostra, són simples i susceptibles de ser emprades per a substàncies volàtils o semivolàtils. Consisteixen en dipositar la mostra en un vial tancat on es deixa en contacte amb el volum d'aire lliure existent (headspace) i una fibra de sílica amb una fase estacionaria absorbent (Shirley, 1999) normalment apolar o lleugerament polar (polimetilsiloxà i/o divinilbenzè, poliacrilats, etc). Un cop adsorbit el contaminant l'absorbent es transfereix a l'injector del cromatògraf de gasos o de líquids mitjançant dispositius especials (Eisert et al., 1997). Els compostos analitzables per aquesta tècnica són els derivats del benzè (per exemple BTEX), hidrocarburs aromàtics policíclics, PCBs, pesticides, dissolvents orgànics, etc. Aquestes tècniques de moment només s'han aplicat per fenols clorats i fenols nitrats (Bartak i Cap, 1997; Ohlenbusch et al., 2000)

1.4.2. Identificació i quantificació

Els compostos fenòlics són una àmplia i heterogènia família de molècules que contenen com a mínim un grup hidroxil unit a un anell aromàtic de 6 carbonis. L'origen d'aquests compostos també pot ésser molt divers, el metabolisme vegetal n'és el principal productor dels anomenats naturals. L'activitat industrial també genera grans quantitats d'aquests compostos, generalment de síntesi com els clorfenols (pesticides, preservadors de la fusta, indústria del blanqueig de la pasta de paper, etc.), que són en general altament tòxics i recalcitrants. Els fenols es caracteritzen per ser molt reactius, s'oxiden amb relativa facilitat i posteriorment es polimeritzen donant lloc a innumerables combinacions de compostos diferents. A la taula 1.4.2 es mostren les famílies dels diferents fenols d'origen natural.

Taula 1.4.2. Principals classes de compostos fenòlics d'origen natural (Harbone, 1980).

Nombre d'àtoms de carboni	Esquelet bàsic	Classe de compost
6	C ₆	Fenols simples, benzoquinones
7	C ₆ - C ₁	Àcids fenòlics
8	C ₆ - C ₂	Acetofenones, àcid fenilacètic
9	C ₆ - C ₃	Àc.cinnàmic, polipropens, cumarines, isocumarines
10	C ₆ - C ₄	Naftoquinones
13	C ₆ - C ₁ - C ₆	Xantones
14	C ₆ - C ₂ - C ₆	Antraquinones, estilbens
15	C ₆ - C ₃ - C ₆	Flavonoids, isoflavonoids
18	(C ₆ - C ₃) ₂	Lignans, neolignans
30	(C ₆ - C ₃ - C ₆) ₂	Biflavonoids
n	(C ₆ - C ₃) _n	Lignines
	(C ₆) _n	Catecolamines
	(C ₆ - C ₃ - C ₆) _n	Tanins condensats

Actualment amb el desenvolupament de les tècniques d'anàlisi és possible quantificar d'una mostra concreta la quantitat total de fenols, així com la d'una família de compostos, o bé un o varis compostos concrets. Per a l'anàlisi dels primers s'utilitzen principalment mètodes espectrofotomètrics i per a identificar i quantificar compostos concrets calen tècniques cromatogràfiques generalment més sofisticades.

1.4.2.1. Mètodes espectrofotomètrics

Els mètodes espectrofotomètrics per a l'anàlisi de fenols es basen en la capacitat dels fenols per a reaccionar amb certs reactius i posteriorment es quantifiquen espectrofotomètricament a una determinada λ . Presenten l'avantatge de ser senzills, ràpids, permeten quantificar una família de compostos i no requereixen instrumentació especial. L'inconvenient principal d'aquests mètodes són les interferències i que cada compost concret presenta una sensibilitat diferent davant el reactiu.

Un altre repte és l'elecció del patró, que en molts casos pot tenir una estructura força diferent als compostos presents en la mostra estudiada. Per aquest motiu aquests mètodes són orientatius del contingut global d'aquestes substàncies, caldrà per tant, l'ús de mètodes que permetin conèixer selectivament els compostos de la mostra.

Entre els mètodes espectrofotomètrics s'han considerat (taula 1.4.3) els que permeten l'anàlisi de fenols totals i els que s'utilitzen per a l'anàlisi de famílies de fenols específics.

1.4.2.1.1. Fenols totals

Entre els mètodes per a la quantificació dels fenols totals tenim al mètode de l'**indol** que està indicat per a l'anàlisi de fenols i homòlegs immediatament superiors (cresols, naftols, etc.). Aquest reactiu reacciona amb els orto i metacresols i no ho fa amb els para, a més substàncies oxidants o reductores i els ions calci i magnesi interfereixen en l'anàlisi per la qual s'aconsella extraure els fenols amb èter (Rodier, 1975).

El mètode de la **4-antiaminopiridina** (4AA) és un mètode molt sensible que s'utilitza com a mètode estandarditzat (APHA, 1976; EPA, 1986), els inconvenients d'aquest mètode són que no reacciona amb els fenols p-substituïts (a excepció dels grups funcionals següents: halogen,

Taula 1.4.3. Relació de tècniques d'anàlisi utilitzats per a la determinació de diferents compostos fenòlics (recull bibliogràfic).

Mètodes d'anàlisi	Reactius	Mecanisme reacció	Tipus d'anàlisi	Referències bibliogràfiques
1. Fenols totals				
Indofenol	a. 2,6-dibromoquinona clorimida (200 mg) en 50 ml d'etanol b. Solució tampó de borat sòdic (10 g)+NaOH (30ml) en aigua qsp 500ml	Redox. Es valora la intensitat de color	Colorimetria 625 nm	Gibbs, 1927
Folin-Denis	a. Tungstat sòdic (100 g) + àc. fosfomolibdic (20 g) + àc. ortofosfòric (50ml) + aigua qsp 1L b. Solució saturada de carbonat sòdic	Redox, formació d'un complex blau. Es valora la intensitat de color	Colorimetria 760 nm	Folin i Denis, 1912 AOAC, 1965 Box, 1983
Folin-Ciocalteu	a. Tungstat sòdic (100 gr.)+àc. Fosfomolibdic (25 g) +àc. ortofosfòric (50ml)+ HCl (100 ml) + sulfat liti (150 g) en aigua qsp 1L b. Solució de carbonat sòdic (30%)	Redox, formació d'un complex blau. Aplicant caseïna (precipiten polifenols) i s'analitza el sobrenedant. Es valora la intensitat de color	Colorimetria 750-765 nm	Folin i Ciocalteu, 1927, Box, 1983; Kuiters i Denneman, 1987; Lowe, 1993
Prince-Butler	a. Clorur fèrric 0,1M en HCl 0.1M b. Ferricianur potàssic (2,63 g L ⁻¹)	Redox, formació del complex blau de Prussia. Es valora la intensitat de color	Colorimetria 720 nm	Prince i Butler, 1977 Graham, 1992
4-Antiaminopiridina	a. Ferricianur potàssic (80 g L ⁻¹) b. 4-antiaminopiridina (20 g L ⁻¹) c. NH ₄ Cl (16,9 g) + NH ₄ OH (143ml)+aigua qsp 250ml	Els fenols reaccionen amb la 4-AA en presència de ferricianur. Es valora la intensitat de color	Colorimetria 510 nm	Emerson, 1943 EPA 9065, 1986
MBTH	a. 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona hidrocloreur (0,5 g L ⁻¹) b. Sulfat cèric amònic (10g)+ 10 ml H ₂ SO ₄ +aigua qsp 12ml c. NaOH (16g)+EDTA(4g)+H ₃ BO ₃ (16g) en aigua-etanol qsp 500ml	Oxidació dels fenols i posterior unió del MBTH en posició para. Es valora la intensitat de color	Colorimetria 490-520 nm	Fiestad et al, 1969 Gales, 1975; EPA 9067, 1986
Acetat Iterbi	Yb(acetat) ₃	Precipitació dels fenols	Anàlisi gravimètrica	Reed et al, 1985

2. Fenols específics

2.1. Tanins totals

Precipitació amb hemoglobina	Solució d'hemoglobina	Precipitació de proteïnes. Es valora la disminució de l'absorbància	Colorimetria 578 nm	Bate-Smith 1973b, Schultz et al., 1981
Precipitació amb seroalbúmina bovina	Sol. tampó d'acetat pH 5 (punt isoelectric) + NaCl (0,17M)+ seroalbúmina bovina (mg/ml) 1) o seroalbúmina marcada amb docecilsulfat sòdic	Precipitació de proteïnes amb la presència de tanins. Es valora la disminució de l'absorbància	Colorimetria 570 nm	Hagerman i Butler, 1980; Asquith i Butler, 1985
Precipitació Gelatina	Gelatina+ permanganat potàssic (1%)	Precipitació de proteïnes amb la presència de tanins. Es valora la disminució de l'absorbància.	Colorimetria 570 nm	AOAC, 1965

2.2. Tanins condensat

Proantocianidina	Sulfat ferros heptahidratat (0,7g)+HCl (50ml)+n-butanol qsp 1L	Despolimerització àcida catalitzada. Les antocianines resultants donen coloració vermella	Colorimetria 550 nm	Swan i Hillis, 1959 Waterson i Butler, 1986
Vainillina	Vainillina (0,5g)+ HCl (4 ml) en metanol qsp 100 ml	La vainillina forma complexos colorats amb els tanins condensats	Colorimetria 500 nm	Burns, 1971

2.3. Tanins hidrolitzables

Rodanina (mètode per Gallotanins)	a. Rodanina (0,667 g) en metanol 100 ml b. H ₂ SO ₄ 1M	Hidròlisi àcida i posterior formació d'un intens color degut a la reacció de l'àc gàlic amb la rodanina	Colorimetria 520 nm	Thies i Fisher, 1972 Inoue i Hagerman, 1988
Mètode per Elhagitanins	a. NaNO ₂ 6% en aigua b. Ac-acètic 6%	Reacció de tanins i productes de la hidròlisi amb el nitrit formant un cromòfor nitrosilat	Colorimetria 600 nm	Bate-Smith 1973*

2.4. o-difenols

Arnow	a. Molibdat sòdic (2%) en etanol/aigua b. NaOH 1N	o-difenols formen quelats amb Mo	Colorimetria 370 nm	Vázquez et al., 1971b
	a. Molibdat sòdic (1g)+nitrit sòdic (1g) en HCl 0,5N b. NaOH 1N	Reacció de nitrosació, seguida de la formació d'un complex vermell	Colorimetria 500 nm	Flanzy i Aubert, 1969 Vázquez et al., 1974

carboxil, àcid sulfònic, hidroxil, metoxil), el grup nitro en posició para inhibeix la reacció i en posició orto bloqueja la reacció (Emerson, 1943). A més, no reacciona amb alguns fenols monohidratats i polihidratats (Cheesman i Wilson, 1972). Box (1983) indica que la 4AA és insensible als compostos fenòlics naturals. Per tant aquest mètode sembla ser més indicat per a l'anàlisi de fenols d'origen sintètic.

Els mètodes de **Folin-Denis** (Folin i Denis, 1912) i **Folin-Ciocalteu** (Folin i Ciocalteu), es diferencien en que a aquest darrer se li ha incrementat la relació de molibdè respecte el tungstè per incrementar en un 30% la sensibilitat i especificitat (Singleton i Rossi, 1965) i s'ha incorporat sulfat de liti per evitar fenòmens de precipitació, especialment amb altes concentracions de potassi (Waterman i Mole, 1994). Aquest mètode ha estat àmpliament estudiat per Box (1983) per a l'estudi de fenols naturals en aigües i presenta l'avantatge de que és molt sensible a gran varietat de compostos fenòlics i polifenòlics, malgrat que la sensibilitat dels diferents compostos és distint. També pot presentar interferències en presència d'agents reductors tant orgànics (amines, àcid ascòrbic) com inorgànics sobretot quan l'extracte a analitzar conté concentracions de sulfurs, sulfits i manganès (II) superiors a 30, 400 i 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivament.

A la taula 1.4.4 es mostren algunes de les substàncies que reaccionen i altres que no ho fan amb els reactius de Folin. El reactiu de Folin-Denis ha estat emprat com a mètode químic estandarditzat (AOAC, 1965) i el reactiu de Folin-Ciocalteu és un mètode estandarditzat per la Societat Canadenca de la Ciència de Sòl (Lowe, 1993) per a l'anàlisi de fenols en sòls. També ha estat el mètode més emprat en nombrosos estudis per a la determinació de fenols naturals en sòls (Morita, 1980; Kuiters i Denneman, 1987; Blum et al., 1991, 1992, 1997; Ohno i First, 1998; Gallet i Keller, 1999) i en l'estudi dels fenols procedents de les olives i residus derivats d'aquestes (Vázquez et al., 1971ab; Maestro et al., 1991; Martínez Nieto, 1992; Borja et al., 1995ab; Beccari et al., 1996; D'Annibale et al., 1998; Amhajji et al., 2000; McDonald et al., 2001).

El mètode de **Price i Butler** és un mètode més nou que el Folin-Denis però ha estat molt poc emprat i no existeixen estudis comparatius amb d'altres mètodes (Waterman i Mole, 1994).

El mètode de la **metil-benzotiazolinona hidrazona** (MBTH) és un mètode que s'empra com a mètode estandarditzat per la EPA (mètode 9067, 1986). Es basa en l'enllaç de la MBTH al fenol en un medi àcid oxidant, l'enllaç es dona en

posició para i si aquesta està ocupada, s'enllaça en les posicions orto lliures. Les principals interferències són les substàncies oxidants (per exemple el clor).

Taula 1.4.4. Recull de substàncies que redueixen i que no els reactius de Folin-Denis i Folin-Ciocalteu (Box, 1983).

Tipus de compost	Substàncies que reaccionen amb els reactius de Folin	Substàncies que no reaccionen amb els reactius de Folin
Orgànics amb grup hidroxil fenòlic	Fenol, metoxifenol, catecols, resorcinol, hidroquinona, pirogallol, ploroglucinol, tribromofenol, aminofenols, àcids salicílic, siringic, sulfosalicílic, hidroxibenzoic, gàllic, vainillic, tànnic, húmics i fúlvics, cresols, xilenol, orcinol, guaiacol, timol, eugenol, carvacol, vainillina, tirosina, naftol, hidroxifenilamina, tanins, lignina i aspergillina.	nitrofenols
Orgànics sense grup hidroxil fenòlic	Piridoxina, àcids úric, amino-benzoic, sulfanílic, nitrilotriacètic i ascòrbic, bases púriques i pirimidíniques, cisteïna, indol, triptòfan, benzaldehid, anilina, metilamina, naftilamina, difenilamina, EDTA, tiourea, feniltiourea, fructosa i proteïnes.	Etanol, àcids tricloracètic, píric, benzoic, cítric, aspàrtic, glutàmic, nicotínic i aminobutíric, dietileter, acetona, , benzoquinona, glucosa, xilosa, urea, hipoxantina, guanidina, glicina, arginina, cistina, prolina, hidroxiprolina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, serina, treonina, valina, asparagina, glicilglicina, fenilacetaldehid, inositol, tris-(hidroximetil)aminometà, EGTA i dipiridil
Inorgànics	Sulfats ferròs amònic, de ferro (II) i manganès (II), nitrit potàssic, cianur sòdic, metabisulfit sòdic, sulfur i sulfits sòdics, clorur d'estany (II), hidrazina i clorur hidroxilamònic.	Tiosulfat sòdic i pirofosfat tetrasòdic.

El **mètode de Reed** et al. (1985) els compostos fenòlics són precipitats amb acetat d'iterbi i posteriorment s'analitzen gravimètricament. Aquest mètode presenta l'avantatge de que no requereix patró, però la precipitació és incompleta a baixes concentracions (Mueller-Harvey, 2001).

1.4.2.1.2. Fenols específics

Per a la **quantificació de tanins totals** les tècniques més emprades són les bioquímiques, aprofitant el poder d'interacció d'aquests amb les proteïnes. Existeixen dos tipus de tècniques, aquelles que determinen la precipitació de les proteïnes en presència de tanins i les que valoren la inhibició de l'activitat d'un enzim concret, per exemple la β -glucosidasa.

Per a l'anàlisi de **tanins condensats**, el mètode de la proantocianidina és el preferit, donat que el de la vainillina tècnicament és molt complicat ja que els resultats varien molt en funció de la temperatura i temps de reacció.

Les anàlisis dels **tanins hidrolitzables** consisteixen en una hidròlisi àcida per alliberar l'àcid gàllic o el·làgic respectivament i posterior reacció amb un cromòfor. En el primer cas cal controlar bé la temperatura i en el segon cal treballar amb nitrogen per evitar l'oxidació del nitrit sòdic (Waterman i Mole, 1994).

Per a l'anàlisi d'**o-difenols** s'aprofita la capacitat d'aquests per formar quelats amb diversos metalls, com el molibdè. Si al reactiu s'hi afegeix nitrit sòdic, esdevé una reacció de nitrosació.

1.4.2.2. Mètodes cromatogràfics

Aquests mètodes es caracteritzen per la seva l'elevada selectivitat i permeten l'anàlisi de compostos fenòlics concrets. La IUPAC els defineix com un conjunt de tècniques de separació que es basen en la migració diferencial dels components de la mostra al llarg del sistema cromatogràfic. Aquesta migració diferencial és deguda a la distribució de les substàncies entre una fase mòbil i una fase estacionària, que es basa en mecanismes diversos (adsorció, partició, exclusió o bescanvi iònic). Entre les tècniques cromatogràfiques més freqüents trobem la cromatografia en capa fina i paper, cromatografia líquida i gasosa, ressonància magnètica, etc.

A la taula 1.4.5 es mostra un recull de les diferents condicions de treball, utilitzats per diferents autors per la identificació per cromatografia de compostos fenòlics diversos.

1.4.2.2.1. Cromatografia en capa fina i paper

Les tècniques de cromatografia en capa fina i paper són tècniques senzilles i eficaces per a identificar compostos. Consisteixen en dipositar l'extracte de la mostra en una placa de cel·lulosa o sílica gel, on es fa passar un solvent que migra arrossegant els diversos compostos que se separen en funció de llur estructura. Un cop secs, els cromatogrames s'observen amb llum natural o a una λ concreta i després es revelen amb diferents reactius que permeten identificar els diferents composts. Aquestes tècniques s'utilitzen molt per a l'anàlisi d'extractes vegetals, però en mostres ambientals l'ús n'és restringit donat que els contaminants acostumen a estar a molt baixa concentració.

1.4.2.2.2. Líquida d'alta resolució (HPLC)

L'HPLC és la tècnica més àmpliament emprada per a la separació i quantificació de compostos fenòlics. Les **columnnes** emprades poden ser de fase normal, farcides amb partícules de sílica polar, o bé, si es treballa en fase reversa (la més emprada), el farcit és de cadenes d'alcans no polars que acostumen a ser de 8 o 18 carbonis (C_8 o C_{18}).

Per a la separació de tanins hidrolitzables s'aconsella treballar amb fase normal (Mueller-Harney, 2001). En canvi per a separar els altres compostos fenòlics s'acostuma a emprar columnnes de fase reversa.

Quan a **fases mòbils**, generalment s'utilitza un solvent orgànic (metanol o acetonitril) i una fase aquosa acidulada mitjançant àcids orgànics o inorgànics (acètic, fòrmic, sulfúric) o amb solucions tamponades (d'acetat, fosfat, etc.). El **pH** de treball ha d'estar entre 2 i 3 unitats per tal de mantenir els fenols protonats i permetre que quedin retinguts (reversiblement) a la columna cromatogràfica. Donat que els diferents fenols tenen polaritats similars, esdevé quasi sempre necessari l'ús de fases mòbils amb gradient, incrementant la fase orgànica amb el temps. El **flux** de treball acostuma a ser al voltant d'1 ml min^{-1} i el temps d'anàlisi entre 30 a 60 minuts.

El detector més emprat és l'UV a una λ entre 220 i 320 nm, sent 280 nm la més emprada. Altres detectors acoblables a l'HPLC són el Diode-Array, el de fosforescència i el de masses, aquest darrer permet conèixer el pes molecular exacte del compost.

1.4.2.2.3. De gasos (CG)

La cromatografia de gasos també és una tècnica molt apropiada per a la identificació de fenols. És un mètode de separació en el qual els components d'una mescla es reparteixen en dues fases: la fase estacionària líquida (més freqüent) o sòlida, que conté una superfície d'exposició molt gran i l'altra, la fase mòbil, és un gas inert (He, Ar, N₂) que circula en contacte amb la fase estacionària. La mostra és vaporitzada en el sistema d'injecció i es transportada per la **fase mòbil** gasosa a través de la columna. El repartiment dels components de la mostra amb la fase estacionària, es basa en les diferents solubilitats en aquesta fase a una temperatura determinada. Per tant, els components de la mescla es separen entre sí en base a les seves pressions de vapor relatives i d'acord amb l'afinitat amb la **fase estacionària**. La fase estacionària pot ser apolar del tipus silicona, dèbilment polar del tipus SE 52 i SE 54 o polar formades per poliglicols. En general els compostos fenòlics no són molt volàtils i per tant es requereix temperatures de treball força elevades (al voltant dels 220-250°C) i s'acostuma a treballar amb gradient. Els detectors més comunament emprats són els d'ionització de flama (FID), de masses (MS) i de captura electrònica (ECD).

1.4.2.2.4. Cromatografia amb detecció per espectrometria de masses (MS)

L'espectrometria de masses és sense dubte la tècnica analítica més completa que existeix avui en dia. Aquesta tècnica permet identificar les molècules (mitjançant el pes molecular o llurs fragments), quantificar amb gran sensibilitat mesclades complexes, a més és universal i específica i proporciona informació estructural de les molècules analitzades (Esteban, 1993).

L'espectrometria de masses és susceptible de ser acoblada a tècniques separatives com les cromatografies de gasos i líquida, per a l'anàlisi de compostos orgànics. En el cas de la cromatografia (tant de gasos com de líquids) un cop separats els analits, detectats i quantificats els pics, la única dada de que es disposa és del temps de retenció i/o l'absorció a determinada longitud d'ona. Aquesta informació pot no ser suficient per a la identificació inequívoca, sobretot en l'anàlisi de mostres complexes. Per tant, l'espectrometria de masses acoblada a aquestes tècniques pot identificar quasi inequívocament qualsevol substància pura.

Els espectròmetres de masses consten bàsicament d'un injector de mostra, una font d'ionització que activa les molècules que després són accelerades i

separades per pesos moleculars gràcies a un camp magnètic i finalment captades per un detector. Tot aquest procés es realitza en un ambient d'alt buit (10^{-6} - 10^{-7} torr). En funció de l'energia que s'apliqui al sistema d'ionització s'aconsegueix fragmentar més o menys les molècules a analitzar. El sistema d'impacte electrònic (EI) ha estat el més emprat, és una tècnica agressiva que comunica un gran excés d'energia a les molècules produint abundant fragmentació. Aquest conjunt de fragments es pot considerar la "empremta digital" de la molècula, però un excés de fragmentació pot dificultar molt la interpretació. Per tant, de vegades és convenient emprar sistemes d'ionització "tous" com la ionització química (CI) mitjançant l'ús d'un gas reactiu que genera ions-molècula positius, negatius o simultàniament ambdós. Altres sistemes són els de ionització i desorció per camp (FI i FD) que es basen en aplicar una diferència de potencial entre dos elèctrodes (un pla i l'altre en forma d'agulla).

L'acoblament d'equips de cromatògrafs de gasos a detectors de masses ha estat relativament fàcil donat que les dues tècniques operen en fase gasosa, l'únic conflicte és que la cromatografia gasosa treballa a pressió atmosfèrica i el masses a alt buit. Els sistemes d'ionització més emprats són el d'impacte electrònic i el d'ionització química. En canvi, l'acoblament a aparells d'HPLC presenta l'inconvenient que la fase mòbil és un líquid i per tant cal eliminar-lo mitjançant tècniques de "Termospray" o "Plasmaspray" que a més d'eliminar-lo, aconsegueix una ionització tova. Un altre inconvenient del sistema és quan cal analitzar molècules orgàniques de gran pes molecular, no volàtils i termolàbils. Per aquest motiu van aparèixer les tècniques d'ionització a pressió atmosfèrica (APCI) que també actuen amb ionització química tova. Existeixen altres tècniques com les de feix de partícules (Particle Beam o PB) que permeten introduir una font iònica convencional (EI, CI). Amb les tècniques de bombardeig amb àtoms ràpids o ions FAB (Fast àtom bombardment) i LSIMS (Liquid secondary ion MS) permeten l'ionització química o per camp sense la necessitat de vaporitzar la mostra líquida, i permetent l'anàlisi de compostos poc volàtils.

Actualment, existeixen espectroteques per comparar els espectrogrames obtinguts amb una col·lecció d'espectres que permeten identificar els compostos encara que no es disposi dels patrons corresponents, l'inconvenient d'aquestes "llibreries" és que només es disposen, en abundància, d'espectrogrames obtinguts pel sistema d'impacte electrònic.

Els mètodes electroquímics com la voltametria cíclica i la cromatografia líquida/electroquímica, són també útils per a l'anàlisi de compostos fenòlics.

La majoria de fenols són electroquímicament actius a potencials d'oxidació moderats. A més, permeten conèixer els potencials redox i identificar els mecanismes d'oxidació.

Taula 1.4.5. Condicions de treball utilitzades per diferents autors per a l'anàlisi de compostos fenòlics naturals mitjançant mètodes cromatogràfics.

Compostos analitzats	Tècnica cromatogràfica	Fase mòbil / gradient / flux (ml min ⁻¹)	Columna/dimensions (mm) / mida porus (µm) / Temp (°C)	Detector	Referències bibliogràfica
Fenols monomèrics	CG-FID	Temp 170°C aire 400 ml min ⁻¹ , N ₂ 10 ml min ⁻¹ H ₂ 25 ml min ⁻¹	SE52 1.32m x 0.32	FID	Kaminsky i Müller, 1978
Fenols monomèrics	HPLC-UV	A: acetoniitril, B: tampó fosfat pH 2.5% de A/ fins 50% de A en 45' i després a 70%A en 5' / 0.8	C ₁₈ f.reversa/250x4.6 / 5 / (50)	280	Burtscher et al., 1982
Fenols monomèrics	HPLC-UV	A: acetoniitril: tampó fosfat 70:30, B: tampó fosfat pH 2: acetoniitril 90:10. / 15% A fins 50% A en 40'	C ₁₈ f.reversa/250x4.6 / 3 / (25)	280	Kögel i Bochter, 1985
Fenols monomèrics	HPLC-UV	A: metanol: aigua 30:2:68 B: aigua: acètic 98:2 100%A i acaba amb 100%B en 37' / 1.2	C ₁₈ f.reversa/125x4 / (25)	180 i 340	Pérez, 1988
Fenols monomèrics	HPLC-UV	A: metanol, B: aigua: acètic (99:1): 10% A gradient fins 60% A en 35'	C ₁₈ f.reversa/150x4/5 / (25)	190-367	Casa et al., 2003
Fenols monomèrics	HPLC-UV-MS	A: metanol: acetoniitril: 0.2M ac. fórmic 40:40:20. B: THF 100% A gradient a 100% B en 40'	PGC f. normal 100x4.6/5/	265 APCI	Vial et al., 2001
Fenols monomèrics	HPLC-UV- Diode array	A: metanol. B: aigua: acètic (99:1). 10% A gradient fins a 60% d'A en 35'	C ₁₈ f.reversa/	190-367	Casa et al., 2003
Fenols monomèrics	HPLC-Diode array	A: metanol B: ac. sulfúric 0.01M Gradient incrementant A/1	C ₁₈ f.reversa	210 i 280	Miranda et al., 2000
Fenols monomèrics	CG-FID	Gradient de temperatura fins 220°C	Chromosorb (60-80) 2m x 4 (400min ₂ min ⁻¹)	FID	Balice i Cera, 1984
Fenols monomèrics i flavonoides	HPLC-UV	Isocràtic, aigua: metanol: acètic 57:40:3	C ₁₈ f. reversa / 300x3.9/10/	254	Young, 1984
o-difenols i derivats del fenil-acètic i propiònic	CG-MS	100°C durant 3' i gradient de 15°C min ⁻¹ fins 280°C isotèrmic durant 10' (H ₂)	SE54 25 m x 0.32 (0.1) SE52 25 m x 0.25	Impacte electrònic	Angerosa et al., 1995 D'Annibale et al., 1999
Fenols monomèrics i flavonoides	HPLC-UV	A: metanol: acètic 97.5:2.5 B: aigua: acètic 97.5:2.5 10%A incrementant A 2% min ⁻¹ / 1.6	C ₁₈ f.reversa/250x4.6 / 4 / (40)	260	Mercadé et al., 1993
Fenols monomèrics, flavonoides, oleuropèina	HPLC-MS	A: metanol: acetoniitril: acètic 95:5:1 B: aigua: acètic 100:1. 5%A incrementant A 100% en 40' / 0.4	C ₁₈ f.reversa/150x4.6/ 5 / (25)	APCI i ESI	Swatsitang et al., 2000 McDonald et al., 2001
Fenols monomèrics i àcids grassos	CG-FID	140°C 2' increment 5°C min ⁻¹ fins 230°C He 40cm s ⁻¹	DB-1 60m x 0.32/0.25	FID	Steen et al., 1994
Fenols monomèrics i flavonoides, glucòsids fenòlics	HPLC-Diode array-fluorescència	A: metanol: acetoniitril: acètic 95:5:1 B: aigua: acètic 100:1. 5% A gradient fins 100% A en 45'	C ₁₈ f.reversa/150x4.6 / 5 / (50)	240 i 280	Ryan et al., 2001

1.5. TRACTAMENT DE SÒLS CONTAMINATS PER OLIASSA

El sòl és un sistema complex i dinàmic condicionat per un elevat nombre de factors naturals (climàtics, geològics, hidrològics, biològics, etc.) i antròpics (agricultura, disposició de residus, canvi d'usos del sòl, etc.), aquests darrers cada vegada són més determinants, on s'hi desenvolupen gran nombre de processos que van condicionant la seva evolució. En general, les funcions del sòl es poden resumir en quatre (Lal, 1998):

- Fer de medi per la producció de biomassa i biodiversitat.
- Regular la qualitat de l'aigua, l'aire i protegir la xarxa tròfica gràcies a la seva capacitat filtrant, neutralitzant, detoxificant i reguladora dels cicles biogeoquímics.
- Preservar els records geològics, arqueològics i astronòmics.
- Fer de suport de l'estructura socioeconòmica, cultural i estètica.

La qualitat del sòl dependrà de la capacitat d'aquest per desenvolupar les funcions que li són pròpies. Així doncs, Karlen et al. (1996) defineix la qualitat del sòl com: la capacitat de funcionar en un ecosistema natural o antròpic, per sostenir la producció vegetal i animal, mantenir o millorar la qualitat de l'aigua i l'aire i promoure la salut humana i la habitabilitat.

Actualment, el creixement i la dispersió de zones urbanes, la contaminació que generen, el desenvolupament industrial, l'agricultura intensiva, l'aprofitament de residus a través del sòl, el canvi climàtic i d'altres factors estan propiciant la degradació d'aquest recurs vital, limitat i no renovable a curt termini, que no és més que la pèrdua total o parcial de la capacitat de desenvolupar les seves funcions. Els principals tipus de degradació es resumeixen a la figura 1.5.1.

Gràcies a la composició extremadament complexa i canviant, en la que destaquen les fraccions col·loïdals, les poblacions microbianes i els fluids, s'explica la ràpida capacitat de resposta del sòl en comparació a les altres matrius ambientals (atmosfera i hidrosfera), enfront els canvis del medi.

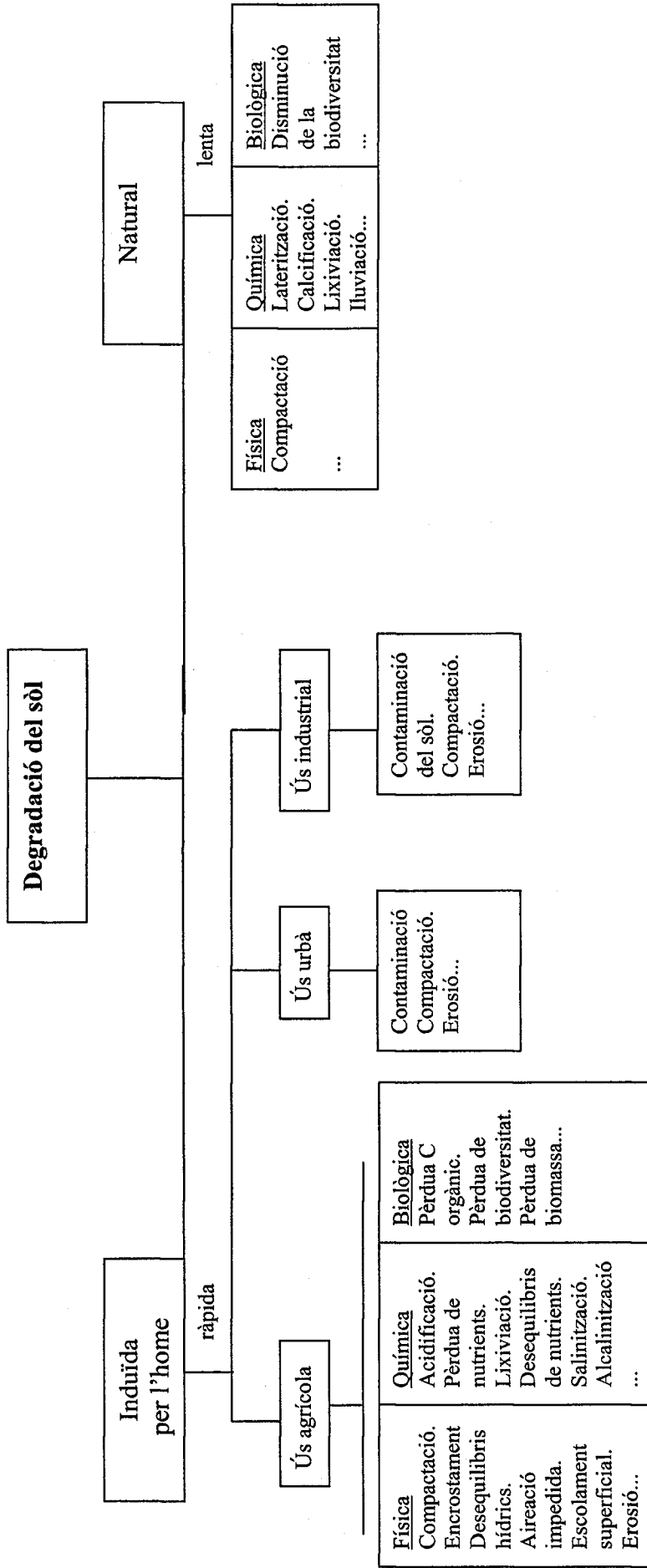


Figura 1.5.1. Principals tipus de degradació de sòls: natural i antropogènica (Adaptat de Lal, 1998).

Amb tot això, la qualitat del sòl també es podria definir com el resultat net entre la resiliència i els processos degradatius, o sigui la capacitat de resposta del sòl per a tornar a l'equilibri dinàmic després d'una pertorbació o modificació del medi (figura 1.5.2).

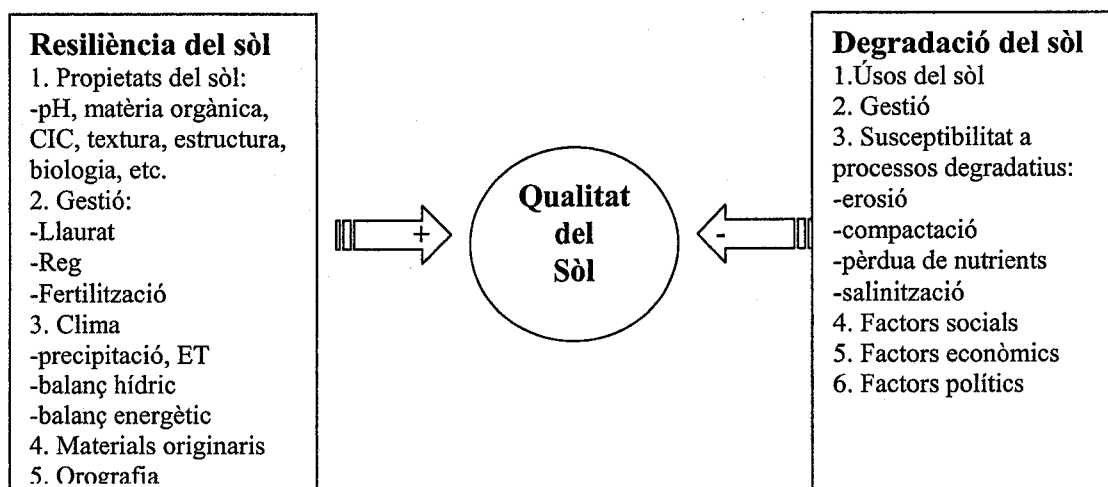


Figura 1.5.2. Principals factors que afecten a la qualitat del sòl (Lal, 1998).

S'entén per **sòl contaminat** aquell que, a causa del seu ús anterior o actual, conté substàncies (contaminants) en concentració superior a les que li són pròpies, que poden afectar les seves funcions i suposen un risc potencial per a les persones i/o l'ecosistema (Junta de Residus, 1997).

Actualment en la gestió de sòls contaminats els esforços es centren no només en la caracterització dels emplaçaments contaminats, sinó també en la investigació dels factors químics, ecotoxicològics i toxicològics que hi estan implicats, amb la finalitat de conèixer la magnitud del risc ecològic i humà (Marlea et al., 2003). Es pot definir el sanejament de sòls com el conjunt de mesures correctores encaminades a reduir, fins a valors acceptables, el risc que suposa per l'home i els ecosistemes.

Tenint en compte aquestes definicions, l'aplicació d'oliassa de forma incontrolada o excessiva pot comportar la degradació i contaminació del sòl principalment per acumulació de sals i compostos orgànics de naturalesa fènolica més o menys recalcitrants i tòxics pels microorganismes del sòl. Tot plegat pot afectar als ecosistemes vinculats al sòl, esdevenint una font

potencial de contaminació de les aigües superficials i subterrànies, i per tant, afectar a les principals funcions del sòl, minvant-ne la qualitat.

Tenint en compte, els sistemes fins ara utilitzats per l'eliminació de l'oliassa (sovint el vessament al sòl) existeix la possibilitat de trobar sòls contaminats per oliassa amb acumulació de sals solubles i/o compostos orgànics de naturalesa fenòlica i resulta convenient conèixer quins són els mètodes més adequats per a sanejar-los i descontaminar-los. A l'àrea mediterrània però, malgrat ser la més perjudicada per aquest tipus d'abocaments massius, no s'ha considerat mai la contaminació del sòl i menys la necessitat de sanejar-los.

1.5.1. Per via biològica

Els sòls que han rebut grans aportos d'oliassa són susceptibles d'acumular valors anormalment elevats de compostos de naturalesa fenòlica, així com també àcids grassos, sucres, polialcohols, etc., que poden tenir efectes negatius sobre els microorganismes del sòl, els vegetals i contaminar també les aigües.

En cas d'arribar a una situació de risc no acceptable, en que fos necessari aplicar tècniques de sanejament, donat que es tracta de contaminants orgànics i per tant "a priori" susceptibles de ser degradats, la tècnica més adequada podria ser la **bioremediació**. La bioremediació com a mètode de sanejament per via biològica és un dels preferits, perquè són tècniques no necessàriament destructives, susceptibles de ser aplicades "in situ" i, per tant, un cop descontaminat el sòl es manté biològicament actiu i la seva capacitat de suport del vegetal no es veu afectada. No s'ha d'oblidar que l'objectiu del sanejament de sòls no ha de ser només l'eliminació de contaminants, sinó també restablir la qualitat del sòl. A més, aquest tipus de tècniques són relativament senzilles i econòmiques en comparació a d'altres.

Les tècniques de bioremediació es defineixen com aquelles que empren processos biològics per reduir o eliminar la contaminació del sòl, amb la finalitat de protegir la salut pública i el medi ambient. Les tècniques de bioremediació són aplicables fonamentalment a contaminants de naturalesa

orgànica tot i que alguns contaminants inorgànics també poden ser-ho i els processos de transformació que intervenen són bàsicament deguts a l'acció de microorganismes, encara que les plantes també hi poden contribuir (Cheng i Mulla, 1999). Les arrels de les plantes estimulen el desenvolupament microbià a la rizosfera (Atlas i Bartha, 1992), la qual cosa afavoreix la degradació de contaminants orgànics (Madsen, 1991; Rogers et al., 1996). En aquest darrer cas es parla de fitoremediació.

Entre les tècniques de bioremediació es poden distingir aquelles que van encaminades a l'**estimulació de l'activitat microbiana** del sòl per tal d'accelerar la degradació de compostos, fonamentalment orgànics, i les tècniques de **fitoremediació**.

La **fitoremediació** consisteix en l'ús de plantes per a remeiar o estabilitzar contaminants tant orgànics com inorgànics de sòls contaminats. Els processos que hi poden estar implicats (EPA; 2003) són: la fitodegradació, que consisteix en la degradació del contaminant tant si es absorbit pel vegetal com si es degradat en el sòl gràcies a la secreció d'enzims o altres substàncies per part d'aquest vegetal; fitoestabilització, que consisteix en la immobilització del contaminant per absorció o adsorció a l'arrel o per precipitació; fitovolatilització, és l'absorció i posterior transpiració del contaminant o d'un metabòlit d'aquest; rizodegradació, és la degradació del contaminant en el sòl per part de l'activitat microbiana estimulada per la presència de la rizosfera; rizofiltració, és la adsorció del contaminant o precipitació sobre les arrels o absorció dins les arrels; control hidràulic, donat que el vegetal absorbeix aigua del sòl.

Les principals limitacions de la fitoremediació són: la velocitat de descontaminació està limitada a la taxa de creixement vegetal i la fondària de les arrels de vegades no és suficient si el plomall és molt profund. En ocasions no es dóna prou protecció a la xarxa tròfica i sovint no es destrueix el contaminant, senzillament es transfereix del sòl a la planta o a l'aire, fet que cal controlar molt acuradament. Tampoc està indicada per a contaminants fitotòxics, com ara l'oliassa. Per tant, aquesta tècnica de sanejament no sembla la més adequada per a sanejar sòls contaminats per oliassa.

Pel que fa a les tècniques encaminades a **estimular l'activitat microbiana del sòl**, en principi més indicades per al sanejament de sòls contaminats per oliassa, es pot potenciar l'activitat microbiana per dues vies: aportant els nutrients i modificant les condicions del sòl per tal d'afavorir el desenvolupament microbià, tècnica que en l'actualitat alguns autors anomenen **bioestimulació**. O bé, es pot introduir al sòl microorganismes adaptats o modificats genèticament amb l'habilitat de degradar contaminants. Aquesta tècnica s'anomena **biomagnificació**. Actualment existeixen pocs estudis que revelin que la biomagnificació acceleri la degradació (Verstraete i Top, 1999). Això és degut fonamentalment, a que en introduir microorganismes en un medi hostil com és el sòl (on hi ha competència amb la microflora autòctona del sòl) fa que no es mantingui la concentració de cèl·lules afegida i, per tant, l'activitat biològica decau (van Veen et al., 1997).

La biomagnificació pot ser una tècnica útil en casos de contaminació recent (després d'accidents), quan els microorganismes autòctons no han tingut temps d'adaptar-se, en aquests casos la biomagnificació pot estimular la degradació en els primers estadis de la bioremediació (Muller i Mahro, 2001). Un fenomen observat en sòls contaminats amb hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH) és que si el sòl prèviament ha estat exposat a contaminants iguals o similars, els microorganismes del sòl estan aclimatats i la degradació esdevé més ràpidament (Sims, 1986). Per tant, mesclant petites quantitats de sòl amb poblacions microbianes aclimatades a sòls contaminats es podria accelerar el procés de biodegradació.

Aquestes tècniques es poden aplicar: "in situ" i permeten tractar el sòl contaminat en el mateix emplaçament on es troba sense ser excavat, o "ex situ" és a dir, excavat el material contaminat. Si un cop excavat, el sòl es tracta en el mateix lloc, llavors es parla de "on site" i un cop sanejat es torna a l'emplaçament inicial, o bé; pot realitzar-se "off site" que consisteix en traslladar el sòl contaminat en un altre indret on es saneja en plantes de tractament adequades generalment mitjançant bioreactors en condicions controlades.

Sovint aplicant tècniques d'estimulació de l'activitat microbiana del sòl, els contaminants no s'acaben de degradar. Aquesta biodegradació incompleta dels contaminants al sòl pot ser deguda principalment a quatre factors:

- Falta de microorganismes apropiats per a degradar el contaminant, tot i que compostos orgànics totalment no biodegradables són poc freqüents.
- Presència de compostos poc biodegradables i/o l'acumulació de metabòlits intermedis tòxics.
- La baixa disponibilitat del contaminant n'evita la degradació.
- Manca de condicions favorables per l'activitat microbiana (oxigen, nutrients, humitat, temperatura, etc.)

La **biodisponibilitat** és un dels factors principals que determina, en molts casos, l'eficàcia de la biodegradació (Mahro et al 2001). La biodisponibilitat pot veure's reduïda per diversos motius: la insolubilitat o immiscibilitat dels contaminants en la fase aquosa del sòl, l'adsorció en la fase sòlida, fins i tot de forma irreversible, la formació de "compostos no extractables "lligats" a la matèria orgànica del sòl, fins i tot, degut al bloqueig o atrapament físic dels contaminants en els nanoporus del sòl.

Per **compost lligat** s'entén substàncies que persisteixen en la matriu sòl en la forma original o d'algun metabòlit després d'extractar-la. L'estudi d'aquests compostos requereix una extracció que no alteri substancialment la seva estructura o de la matriu del sòl i posteriorment la naturalesa de l'enllaç es pot esbrinar per tècniques analítiques sofisticades de caràcter destructiu (Fuhr et al., 1998). Segons (Kästner i Richnow, 2001) qualsevol substància química antropogènica és susceptible de formar aquest tipus de residus quan entra en contacte amb el sòl. És un procés principalment biològic, en el qual els contaminants són incorporats mitjançant enllaços covalents als compostos húmics del sòl. L'alliberació dels contaminants lligats esdevindrà lentament i amb posterioritat gràcies a processos de mineralització de la matèria orgànica humificada del sòl i el temps de semivida d'aquests contaminants serà equivalent als dels compostos húmics del sòl (Northcott i Jones, 2000). La formació d'aquests lligams redueix la bioaccessibilitat i biodisponibilitat significativament i pot considerar-se com un procés natural de detoxificació (Bollag i Loll, 1983; Berry i Boid, 1984). Estimular-ne la formació es considera

una alternativa per a la bioremediació de sòls contaminats per compostos antropogènics (Bollag i Bollag, 1990).

Quan un contaminant és retingut per atrapament físic en els nanoporus del sòl, els microorganismes hi tenen difícil accés. Aquest fet s'ha observat amb diferents compostos aromàtics i pesticides i la biodisponibilitat disminueix amb el pas del temps (Alexander, 2001).

Alguns estudis demostren que només una petita part dels residus lligats o bloquejats (<1%) pot ser alliberada amb el temps. Això en facilitarà la dilució i la posterior degradació i per tant, en principi, no hauria de tenir efectes ecotoxicològics remarcables (Fuhr, 1987).

1.5.1.1. Factors que afecten l'estimulació de l'activitat microbiana

Els principals factors que afecten als processos de bioremediació depenen fonamentalment del tipus de contaminant, de les propietats del sòl i de les condicions ambientals, i lògicament de les múltiples interaccions contaminant-sòl que poden produir-se. A continuació es fa un petit comentari dels paper que hi juguen cadascun dels factors indicats.

Les **característiques del contaminant** que poden influir en l'èxit de la biodegradació són aquelles que poden afectar al transport o retenció, la toxicitat i la biodegradabilitat o recalcitrància d'aquest. La mobilitat d'un contaminant afavoreix el transport i per tant disminueix la retenció i el temps de residència en el sòl, la qual cosa va en detriment de la seva biodegradació per part de la microflora del sòl. Els paràmetres que es relacionen amb la mobilitat i la retenció són: la solubilitat i immiscibilitat en aigua, els coeficients de partició o afinitat del contaminant pel sòl o la fracció orgànica (K_d , K_{oc} , K_{ow} , etc.), la pressió de vapor o constant de Henry (transport en fase vapor), així com la càrrega, el pK_a , el pes molecular i els grups funcionals (relacionats amb la reactivitat i la degradabilitat). En general grups moleculars que contenen C, H, I, Br i Cl donen hidrofobicitat a la molècula, mentre que el N, P, S i O aporten hidrofília (Sims et al., 1989).

Els contaminants orgànics és poden classificar en tres grups d'acord amb la seva biodegradabilitat quan entren en contacte amb el sòl (Figura 1.5.3).

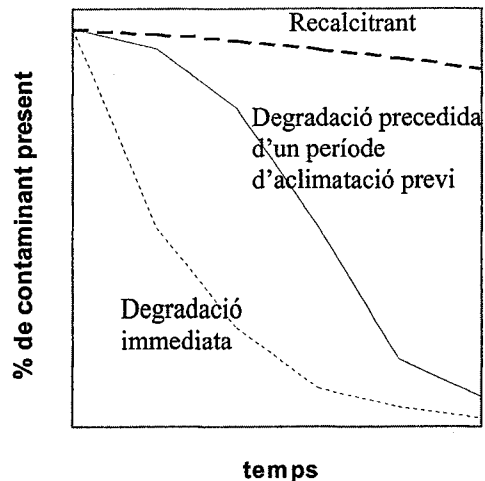


Figura 1.5.3. Modes de degradació dels compostos orgànics (Scow, 1982).

- Aquells que la biodegradació s'inicia immediatament quan entren en contacte amb el sòl, donat que són emprats com a font d'energia. Entre aquests trobem als sucres, pèptids i polímers naturals (proteïnes, cel·lulosa). Les oliasses contenen grans quantitats d'aquests tipus de substàncies (sucres, proteïnes, polialcohols, àcids orgànics no fenòlics, etc.).
- Aquells que la biodegradació comença lentament i s'accelera després d'un procés d'aclimatació, com per exemple la cel·lulosa cristal·lina i bona part de compostos antropogènics. En aquest grup podrien estar inclosos els compostos fenòlics monomèrics de l'oliassa.
- Aquells que es degraden lentament o no del tot. En aquest grup es troben els biopolímers naturals tipus lignina, compostos húmics i la majoria de compostos orgànics recalcitrants com ara els hidrocarburs aromàtics policíclics, pesticides organoclorats i altres molècules d'origen industrial com ara els materials plàstics. El pigment fenòlic de l'oliassa entraria dins d'aquest grup perquè constitueix una macromolècula que pocs microorganismes són capaços de separar els diferents compostos de la matriu polifenòlica, per a la posterior degradació (Pérez, 1988).

Certes **proprietats químiques** del contaminant poden afectar també a la biodegradació, com ara el pes i estructura molecular, el nombre i tipus de grups funcionals, la posició dels substituents, etc., a la taula 5.1.1 se'n detallen algunes. Els substituents tipus clor, brom, sulfonat o nitro són molt poc freqüents en compostos d'origen natural i totalment absents són els grups fluor o azo units a anells aromàtics. L'oliassa en principi no conté substàncies d'aquest tipus, o en tot cas en molt baixa concentració si s'han afegit pesticides durant el conreu de l'olivera i el rentat de les olives no s'ha efectuat adequadament.

Taula 5.1.1. Influència de l'estructura en la biodegradabilitat d'un compost orgànic (Haider, 1999).

Tipus de compost o lligand	Biodegradabilitat	
	Alta	Baixa
Carbohidrats	Carbohidrats alifàtics Cadenes de fins a 12 C Cadenes lineals Compostos aromàtics amb un o dos nuclis	Alcans d'alt pes molecular Cadenes ramificades Hidrocarburs poliaromàtics
Tipus de substituent de l'anell aromàtic	-OH, -COOH, -CHO, -NH ₂ , -CH ₃ , -OCH ₃	-F, -Cl, -NO ₂ , -CF ₃ , -SO ₃ H
Posició del substituent	Posicions p- Fenols o- o p- disubstituïts	Posicions o- o m- Fenols m- disubstituïts
Bifenils i dioxines	Sense o com a màxim un grup -Cl	Policlorats
Parafines clorades	Pocs grups -Cl i lluny de la C	Molts grups -Cl i directament en C

La capacitat recalitrant també està molt relacionada amb la solubilitat, els compostos insolubles rarament arriben als llocs reactius de les cèl·lules microbianes i per tant els microorganismes només degraden els compostos que estan dissolts en aigua (Thomas et al., 1986; Bouchez et al., 1995), per aquesta raó la transferència del contaminant a la fase aquosa és un requisit per a la biodegradació. Alguns microorganismes poden absorbir contaminants hidrofòbics directament per la membrana sense que passin a la fase aquosa (Efroymsen i Alexander, 1991), aquest fet és de rellevant importància per sanejar emplaçaments contaminats amb hidrocarburs, olis i altres contaminants hidrofòbics.

Bona part de la càrrega orgànica de l'oliassa és soluble en aigua, aquest fet n'afavorirà la biodegradació. I tenint en compte que els fenols presents contenen grups àcids, aldehids i metoxi, i que bona part són o-difenols, farà que siguin més fàcilment degradables. El pigment de l'oliassa, d'alt pes molecular, cadenes ramificades i hidrocarburs poliaromàtics, serà probablement el component més recalitrant de l'oliassa.

Les **característiques del sòl** lògicament tenen una gran importància per al desenvolupament dels processos de bioremediació a per acció dels microorganismes. Els paràmetres que tenen major transcendència i que per tant caldrà estudiar en un emplaçament contaminat són:

- Les característiques de tipus físic, com la **textura, estructura i porositat** que influeixen fonamentalment en la dinàmica de fluids (aigua i aire) afectant, per tant, sobretot en el transport dels contaminants (dispersió i difusió). En sòls de textura fina la permeabilitat és baixa, fet que pot dificultar l'aport d'oxigen i nutrients per als microorganismes, però alhora la capacitat de retenció d'aigua es veu afavorida.
- Quant a les característiques de tipus físico-químic, el **pH del sòl** pot afectar l'activitat microbiana. En general els fongs són més tolerants a pH baixos (per sota de 5) que els bacteris. Els sòls àcids tindran doncs una menor capacitat de biodegradació que els bàsics ja que els bacteris tindran una actuació més restringida en aquestes condicions.
- Les característiques químiques del sòl també hi juguen un paper destacat. Així per exemple, la presència en excés de **sals solubles** també pot ser un factor limitant del creixement dels propis microorganismes del sòl com de plantes. La rizosfera és probablement la zona del sòl amb més activitat biològica. El contingut de **matèria orgànica** (que acostuma a disminuir en fondària) influeix de forma molt activa en la retenció de contaminants, disminuint per tant la mobilitat d'aquests. La seva presència va molt lligada a l'activitat biològica del sòl donat que és una font de **macro i micronutrients** que són essencials per al creixement dels microorganismes. Aquests han d'estar en forma assimilable i en concentració i proporció adequades. En general, en sòls els micronutrients

no acostumen a faltar (Turco, 1999), en canvi alguns macronutrients com el nitrogen i fòsfor acostumen a faltar, o no estar en proporció adequada, particularment quan el contaminant és ric en carboni i pobre en aquests. O'Connor i Young (1993) observaren que l'aplicació de nitrogen en sòls contaminats per fenol pot estimular la degradació fins al doblar-la. La EPA recomana relacions de carboni, nitrogen i fòsfor de 120:10:1 (Sims, 1993).

- Les **característiques biològiques** lògicament hi tenen un paper fonamental, donat que els microorganismes són els principals responsables dels processos de biodegradació dels contaminants. L'horitzó superficial del sòls pot contenir unes 10.000 espècies diferents i uns 10^9 microorganismes per gram (Torvik et al., 1990), suposen menys del 3% de carboni orgànic i ocupen un 0,001% del volum del sòl (Sparling, 1985). Els estudis de bioremediació han d'establir les condicions físiques, químiques i biològiques per obtenir la màxima activitat biològica.

Les característiques **ambientals** també poden tenir una influència destacada en l'activitat microbiana (humitat, oxigen i temperatura). Els nivells òptims, per al desenvolupament dels microorganismes, d'alguns paràmetres del sòl i condicions del medi estan resumits a la taula 5.1.2.

Taula 5.1.2. Factors crítics per l'activitat microbiana (Sims, 1986).

Factor ambiental	Nivells òptims
Aigua disponible	25-85% capacitat de camp; -0.01Mpa
Oxigen	-Metabolisme aeròbic: $>0,2 \text{ mg L}^{-1}$ d'O ₂ dissolt. Mínim volum d'aire en l'espai porós 10%. -Metabolisme anaeròbic: concentracions d'O ₂ inferiors al 1%
Potencial redox	-Microorganismes aeròbics i anaeròbics facultatius $> 50 \text{ mV}$ -Microorganismes anaeròbics $< 50 \text{ mV}$
pH	5,5-8,6
Nutrients	Suficient N, P i altres nutrients que no limitin el creixement microbià. Es recomana una relació de C:N:P de 120:10:1
Temperatura	15-45 °C (mesòfils)

L'**aigua** és indispensable per a la vida dels microorganismes, a més a més, fa de medi de transport tant dels contaminants com dels nutrients, influeix en l'estat d'aïració, naturalesa i quantitat de compostos solubles i també condiciona la pressió osmòtica i el pH de la solució del sòl. Els bacteris i fongs

tenen màxima activitat a potencials entre $-0,01$ i $-0,05$ MPa, això correspon, en un sòl argilós, a un 40-50 % de la capacitat de camp. L'activitat decreix per sota de $-0,5$ MPa i és negligible a -8 Mpa. Els fongs tenen possibilitat de sobreviure fins a -10 MPa. En sòls contaminats per oliassa és habitual la manca d'humitat necessària per assolir la màxima activitat biològica.

El principal acceptor d'electrons emprat per a la majoria de microorganismes és l'**oxigen** present a l'atmosfera del sòl. Aquest és consumit per l'activitat microbiana, altres organismes i la respiració de les arrels. L'oxigen penetra al sòl des de l'atmosfera per difusió a través dels porus del sòl. La difusió pot veure's restringida en cas que els porus del sòl estiguin plens d'aigua. Si aquests són petits, amb poca humitat quedaran saturats, per tant la porositat és qui determina la velocitat de difusió de l'oxigen. Si el consum d'oxigen és més ràpid que l'aport, el sòl es torna anaeròbic, llavors s'esdevenen canvis en l'activitat i composició de les poblacions de microorganismes del sòl, entrant en acció doncs, microorganismes facultatius aerobis i/o anaerobis que en aquest cas empraran el NO_3^- , Fe^{3+} Mn^{4+} o SO_4^{2-} com a acceptor terminal d'electrons. Per a mesurar la densitat d'electrons dels sistema s'empra el potencial redox.

Els nivells d'oxigen del sòl es poden mantenir evitant-ne l'excés d'aigua (hidromorfia), amb la presència de materials sorrencs o llimosos, llaurant, evitant la compactació, limitant l'aport de carboni addicional (Huddleston et al., 1986) i afegint fonts d'oxigen. L'oxigen es pot aportar bombant aire o oxigen i aplicant aigua oxigenada de forma molt acurada ja que és tòxica per als microorganismes a concentracions més grans de 100 mg L^{-1} (Morgan i Watkinson, 1992).

Finalment un dels factors que més influeix en l'activitat biològica del sòls és la **temperatura**. A 0°C la biodegradació es para (Sims, 1989) i en general l'activitat metabòlica es dobla per cada increment de 10°C (Baker, 1994). La temperatura òptima per a la bioremediació està entre 20 i 30°C (Cheng i Mulla, 1999) i ve controlada bàsicament per les oscil·lacions diàries i estacionals de la temperatura en la superfície del sòl.

1.5.1.2. Estudis previs per al sanejament mitjançant l'estimulació de l'activitat microbiana

Previ a qualsevol acció de sanejament a escala real, és imprescindible realitzar simulacions a escala de laboratori i a escala pilot, a fi i efecte d'observar les possibilitats de bioremediació i establir quines són les condicions més adequades per al sanejament de l'indret contaminat. En últim terme, les limitacions de la bioremediació d'un sòl contaminat estan normalment relacionades amb el temps necessari per al sanejament, el nivell de descontaminació que es vol assolir i el cost. Els sistemes de simulació de la biodegradació de contaminants en sòls es poden classificar en dos tipus (Hupe et al., 2001):

- Sistemes oberts que permeten conèixer els processos físics, químics i biològics i els efectes ocasionats per factors abiòtics, condicions ambientals, i fenòmens de transport, sorció, comportament hidrogeològic, etc. Els sistemes oberts més emprats són els lisímetres, contenidors i mesocosmos, etc.
- Sistemes tancats que s'empren per a fer balanços de matèria (inclosa la biomassa) amb la finalitat d'avaluar totes les vies d'eliminació, atenuació i emissió del contaminant, en condicions controlades. Els més emprats són el respiròmetre tradicional discontinu (on el CO₂ emès es recull en una solució de NaOH i es valora amb HCl); els respiròmetres electrolítics que van generant oxigen a mesura que és consumit, i els bioreactors estàtics i dinàmics.

Si es va determinant la concentració de contaminant periòdicament, aquests sistemes permeten estudiar la velocitat de degradació dels contaminants que s'acostuma a expressar com al temps de semivida. El temps de semivida d'un contaminant representa el temps que es requereix per a que el 50% de la concentració inicial del contaminant desaparegui, basat en un model cinètic de primer ordre, que és el més habitual. Aquests sistemes permeten mesurar, si s'acoblen a sistemes de detecció de gasos, compostos orgànics volàtils, així com la mineralització real del contaminant si s'utilitzen tècniques de detecció d'elements marcats (¹³C, ¹⁴C).

1.5.2. Per rentat

L'acumulació de sals solubles és un dels principals factors de la degradació de sòls, que afecta molt negativament a la productivitat dels conreus. Tot i que en el cas de sòls afectats per oliassa no és aquest el problema més important, sinó la presència de compostos fenòlics amb possibles efectes ecotoxicològics.

Per recuperar sòls salins es necessari el **rentat de les sals**, mitjançant el qual, o bé, són transportades a horitzons més profunds que els explorats per les arrels, o bé, són evacuats des del perfil del sòl mitjançant la construcció xarxes de drenatge.

La quantitat d'aigua a aplicar per a produir el rentat de les sals dependrà de les característiques del sòl, de l'aigua de reg emprada i de la salinitat final que es pretén assolir a la zona radicular. Els principals factors a tenir en compte són:

- La fracció de rentat, que representa la part d'aigua de reg que travessa la zona radicular i és susceptible de rentar les sals.
- La permeabilitat (capacitat d'infiltració d'aigua del sòl) ha de ser bona per un rentat efectiu, sinó serà necessari instal·lar drenatges per evitar l'acumulació d'aigua i de sals a la zona radicular.
- Qualitat de l'aigua de reg, especialment pel que fa a paràmetres com la salinitat i relació d'adsorció de sodi (SAR).
- El tipus de sals presents en el sòl, particularment pel que fa al grau de solubilitat que puguin presentar.

Per altra banda, s'ha de considerar també la possibilitat d'utilitzar tècniques de reg més adequades per facilitar el rentat o per fer possible el creixement vegetal en condicions de salinitat moderada (inundació, aspersion, gota a gota, etc.).

Finalment, cal tenir en compte que el reg facilita el rentat de les sals, però també pot afavorir, en sòls contaminats per oliassa, la lixiviació de compostos orgànics solubles, susceptibles de contaminar les aigües d'infiltració i per tant les aigües subsuperficials i subterrànies.

L'eliminació de sals s'efectua de diferent forma si el problema és el sodi i la seva acumulació al complex de canvi (Percentatge de sodi intercanviable o PSI superior al 15%).

Donat que les oliasses en general tenen una relació d'adsorció de sodi baixa (SAR), és a dir no contenen massa sodi respecte al calci i magnesi i per tant, no hi ha, en principi, risc de sodificació del sòl. A no ser que se li hagi afegit posteriorment (hidròxid sòdic per exemple per a neutralitzar-la). Fins i tot en aquest cas, la presència de carbonats al sòl (cas que en tingui) pot evitar que el sodi domini el complex de canvi (PSI < 15%). La majoria de sals de l'oliassa són potàssiques i en general presenten baixa toxicitat per a les plantes.

En el cas molt improbable de que l'oliassa arribés a sodificar el sòl caldria desplaçar al sodi del complex de canvi mitjançant l'aplicació d'esmenes que aportin elements i substàncies capaces de desplaçar al sodi i estructurar el sòl com ara calci, ferro, matèria orgànica i productes generadors d'àcid (sofre, àcid sulfúric, sulfat ferrós, etc.).

1.5.3. Atenuació natural

L'atenuació natural és un procés no destructiu per a descontaminar sòls i, fins i tot, recuperar-los i d'aigües subterrànies que aprofita la capacitat autodepuradora del sòl mitjançant processos de naturalesa física, química i biològica, per reduir la concentració i quantitat de contaminants. Això implica deixar els contaminants a l'emplaçament contaminat mentre els processos naturals van actuant sobre els contaminants: transportant-los (dispersió, solubilització, volatilització), fixant-los (absorció i adsorció) i/o biodegradant-los (Ruiz-Saucedo et al., 2000). L'eficàcia de l'atenuació natural dependrà del contaminant, tipus de sòl i de les condicions ambientals.

Durant la dècada dels noranta ha estat una tècnica molt emprada per a sanejar aigües subterrànies contaminades (MacDonald, 2000). És una tècnica que presenta l'avantatge de que es realitza "in situ", no origina residus secundaris, no hi ha perill d'exposició per als treballadors (cas d'haver d'actuar "ex situ") i, sobretot, és més econòmica que d'altres sistemes. Els principals inconvenients són: la durada del tractament; només és aplicable per zones on el risc de mobilitat és baix; cal caracteritzar, monitoritzar i protegir l'emplaçament durant més temps; els productes de descomposició poden incrementar la toxicitat i/o mobilitat; les condicions hidrogeològiques poden canviar i de vegades cal fer campanyes de conscienciació social (Förstner i Gerth, 2001).

Actualment aquest mètode de descontaminació "passiu" s'està adoptant com una tècnica més de sanejament. Així per exemple la ASTM (1998) va publicar una guia amb una sèrie de recomanacions per a l'atenuació natural d'emplaçaments contaminats amb derivats del petroli. En nombrosos treballs s'ha estudiat l'evolució de diferents contaminants com ara els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH) (Lors et al., 2000), pel benzè, toluè, xilè i etilbenzè (BTXE) (Meier-Löhr i Battermann, 2000), pels organoclorats (Riis et al., 2000) i fins i tot contaminants inorgànics (Gerth, et al., 2001).

De totes maneres, no s'ha d'oblidar que l'atenuació natural presenta moltes limitacions (Christensen et al., 2000), entre elles, permetre la presència d'un emplaçament contaminat sense actuar-hi directament. Qualsevol indret així, és una amenaça constant ja que contribueix a difondre el contaminant a altres medis i poden transferir-se a la xarxa tròfica.

Per tant, abans d'autoritzar actuacions d'aquesta mena convé seguir investigant la dinàmica de tot tipus de contaminants en el medi ambient i el risc ambiental i sanitari associat, per arribar a predir o simular com evolucionaran aquests contaminants en un futur si no se'ls retira d'una forma més ràpida.

2. OBJECTIUS

En la societat actual, cada vegada més industrialitzada, on el consumisme és el motor central de l'economia mundial, els residus són progressivament més protagonistes indesitjats del nostre món. I són ja tants els abocaments i emissions al medi (sòls, aigües i atmosfera) que tot plegat pot trencar l'equilibri ecològic mundial, posar en perill les qualitats de la Terra com a suport de la vida, i esdevenir una catàstrofe ecològica i constituir una seria amenaça per la salut humana.

Per tant, qualsevol disciplina o treball encaminat a la minimització, tractament, valorització i disposició adequada dels residus, i en definitiva procurar una millora en la gestió d'aquests, és benvinguda per a la sostenibilitat del nostre planeta. És en aquest marc on es pretén ubicar aquest treball.

Concretament pel que fa a la producció de l'oli d'oliva, és una activitat típicament mediterrània l'origen de la qual s'estima des de fa 6.000 anys, que ha anat evolucionant i apostant per la minimització dels residus. Com exemple la transformació del sistema de producció utilitzats, de tres fases a dues. Malgrat això, es generen grans volums de residus en un espai curt de temps que impacten fortament sobre el medi ambient.

Pel que fa a les oliasses, és un subproducte que, malgrat que el canvi de sistema d'extracció n'ha reduït considerablement el volum generat, encara se'n generen i és un problema ambiental de primer ordre a algunes zones d'Andalusia, Marroc, Tunísia, Turquia, Grècia, etc.

Les alternatives a la disposició i rebuig de les oliasses, com ara la depuració o valorització d'alguns compostos, ha estat objecte de molts estudis i algunes alternatives són potencialment viables. Però la falta de solvència i millors tecnologies en el sector, fa que resulti més econòmic la valorització d'aquests subproductes a través del sòl, fet que ha estat motiu de normatives específiques.

Si un dels destins finals d'aquest subproducte ha de ser el sòl, és convenient conèixer el seu comportament i els efectes que origina sobre el medi, fent

especial ressò a l'estudi sobre les propietats del sòl. El sòl és la matriu ambiental amb més capacitat de transformació, malgrat això aquesta capacitat és limitada i no tots els residus són aptes per a ser reciclats a través d'aquest. Per tant, abans de valoritzar indiscriminadament aquest subproducte convindria fer un balanç dels aspectes **ambientals** i els **agrològics** amb la finalitat d'aprofitar els beneficis que comporta els reciclatge dels seus nutrients a través del sòl, sense malmetre el medi. Per tot això, es proposen els següents objectius:

- Caracteritzar l'oliassa des del punt de vista agrològic i ambiental, fent especial èmfasi en les propietats de la càrrega fenòlica i la seva dinàmica en sòls.
- Trobar un mètode adequat d'extracció, quantificació i identificació de compostos fenòlics en sòls que han rebut oliassa i no.
- Caracteritzar un emplaçament contaminat de forma massiva per oliasses i estudiar-ne l'evolució per atenuació natural a llarg termini.
- Avaluar el possible benefici o impacte que sobre les aigües d'infiltració i el propi sòl pot ocasionar l'aport reiterat d'oliassa a dosis agronòmiques, mitjançant simulació en columnes lisimètriques al laboratori.
- Estudiar l'efecte de l'aport d'oliassa al sòl sobre l'activitat biològica d'aquest, observar si els compostos fenòlics són degradats pels microorganismes del sòl i establir quines són les condicions més adequades per a biodegradar-los. Aquesta informació ha d'anar encaminada a donar unes bases útils per al sanejament per via biològica de sòls contaminats per oliassa.
- Comprovar si els resultats obtinguts en els diferents experiments de laboratori poden ser vàlids per interpretar el que succeeix en condicions reals de camp.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIALS

Els materials emprats per a realitzar la part experimental d'aquesta tesi corresponen principalment a mostres de sòls de diferents zones de Catalunya i dues mostres d'oliassa obtingudes per procediments industrials diferents.

Les mostres de sòls utilitzades son descrites en els diferents subapartats que es s'estableixen a continuació.

3.1.1. Sòls d'abocador d'oliasses

El primer grup de sòls estudiat correspon a un abocador incontrolat d'oliassa, situat al municipi de Santa Bàrbara (comarca del Montsià). L'emplaçament és situat a uns 7 km del riu Ebre. La morfologia dominant de la zona està formada per planures de terraplè al·luvial i el material litològic és de naturalesa sedimentària, constituït per crostes calcàries i conglomerats. L'altitud és d'uns 100 metres i la pendent nul·la.

L'extensió del terreny que es destinà a l'abocament és d'uns 6.850 m² i, previ a l'aplicació d'oliassa, va ésser excavat per a la construcció d'unes basses amb la finalitat d'eliminar oliasses per evaporació natural. La construcció de les basses es va realitzar retirant uns 20 cm superficials de sòl i amb el material extret es va construir les parets de les basses. No es va emprar cap tipus de material impermeabilitzant. Les dimensions de les basses eren de superfície variable entre 250 i 500 m² i d'uns 80 cm de fondària aproximadament. L'abocador contenia quatre basses longitudinals i diverses basses col·locades de forma transversal (figura 3.1.1). L'aport d'oliassa s'efectuava sobre les primeres i l'oliassa es repartia per les altres donat que totes estaven comunicades entre sí.

En la fotografia aèria de l'emplaçament, realitzada a l'estiu del 1990 es pot distingir la zona d'abocament (coloració més negra) dels camps d'olivera propers. Donat que la fotografia es va realitzar fora de la temporada de mòlta i en període d'estiu, les basses es trobaven quasi bé seques.

El vessament d'oliassa es va efectuar durant nou campanyes entre els anys 1985 i 1994 (taula 3.1.1), el volum total d'oliassa aplicat va ser aproximadament d'uns 40.600 m³, que equival a dipositar una columna d'oliassa d'uns 5 o 6 metres d'alçada sobre la superfície indicada. L'oliassa aplicada procedia fonamentalment d'un molí de tres fases amb un sistema d'extracció continu mitjançant centrífuga.

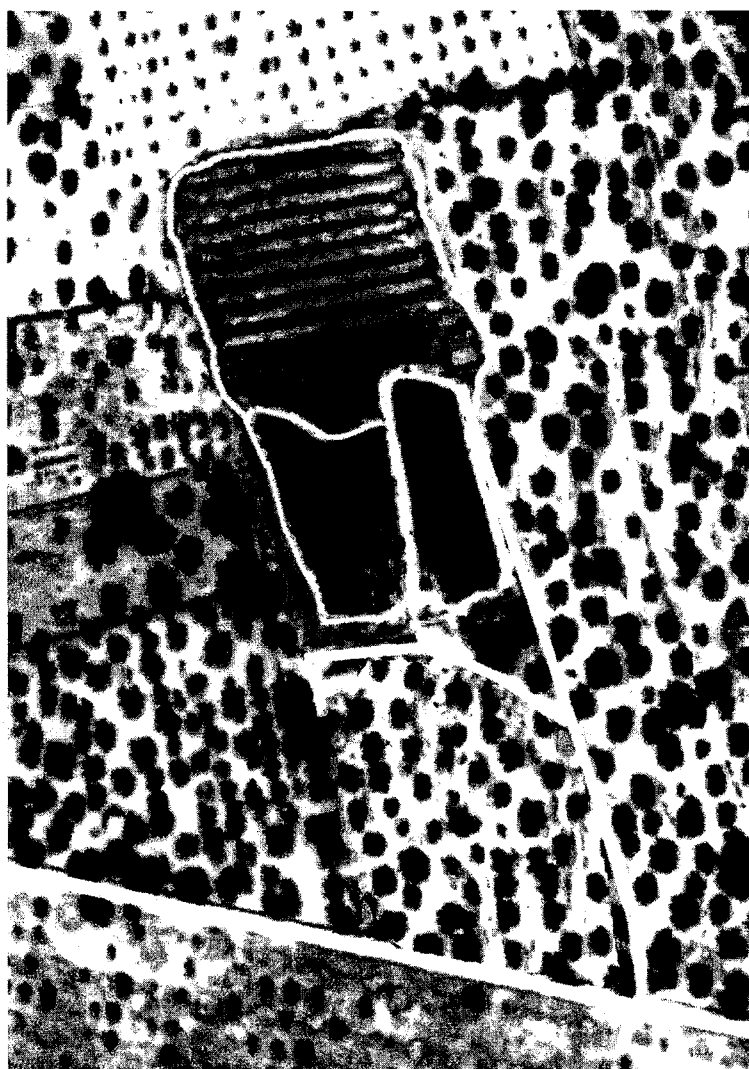


Figura 3.1.1. Fotografia aèria de l'abocador.
Realitzada per l'Institut Cartogràfic de Catalunya, el 7 de juliol de 1990. Codi de vol 90.022, P-7 (522) fotograma 8406.

Un cop clausurat l'abocador (any 1995), es va procedir a la retirada dels residus sòlids dipositats (el sediment de l'oliassa), que tenia un gruix variable entre 25 i 50 cm. Aquests sediments es van apilar en alguns punts del mateix emplaçament. Després es van desmantellar les parets de les basses i s'anivellà el terreny tal i com es mostra a l'esquema de la figura 3.1.2.

Taula 3.1.1. Volum d'oliassa abocat per campanya.
Dades cedides per la Cooperativa Agrícola de Santa Bàrbara.

Campanya	Volum d'oliassa aplicat (m³)
1985-86	4.500
1986-87	5.200
1987-88	7.000
1988-89	1.800
1989-90	6.300
1990-91	860
1991-92	5.800
1992-93	4.200
1993-94	5.000
Total	40.660

L'equip d'investigació de la Unitat d'Edafologia no es va assabentar de l'existència d'aquest abocador fins la seva clausura, concretament l'any 1996. A partir de llavors es van efectuar tres mostrejors (anys 1996, 1997 i 2001) per tal d'estudiar l'evolució de l'emplaçament.

El **primer mostreig** es va efectuar l'any 1996 quan feia un any que l'abocador era clausurat. En fer els primers mostrejors s'observà que el terreny estava molt remogut i presentava forces irregularitats. En alguns punts a una fondària de 20 a 25 cm s'hi trobava una capa negra de material orgànic que corresponia a restes de sediment dels fons de la bassa que no s'havia eliminat prou bé. En una part de l'abocador es pogué identificar una zona corresponent a una de les dos grans basses longitudinals on ni tant sols s'havia extret el residu sòlid acumulat i únicament s'hi havia aportat terra per "maquillar" l'aspecte del terreny. Aquest punt que corresponia el fons d'una bassa intacta, presentava un gruix de sediment d'oliassa d'uns 50 cm i encara contenia bossades d'oliassa líquida. En aquest punt s'hi efectuà la descripció d'un perfil edafològic, el qual s'anomenà PERFIL BASSA i que s'ha considerat com a la situació en què es trobaven les basses just abans de la clausura de l'abocador. En l'estudi de l'evolució de l'abocador, aquest perfil s'ha considerat com a temps inicial o zero després de la clausura.

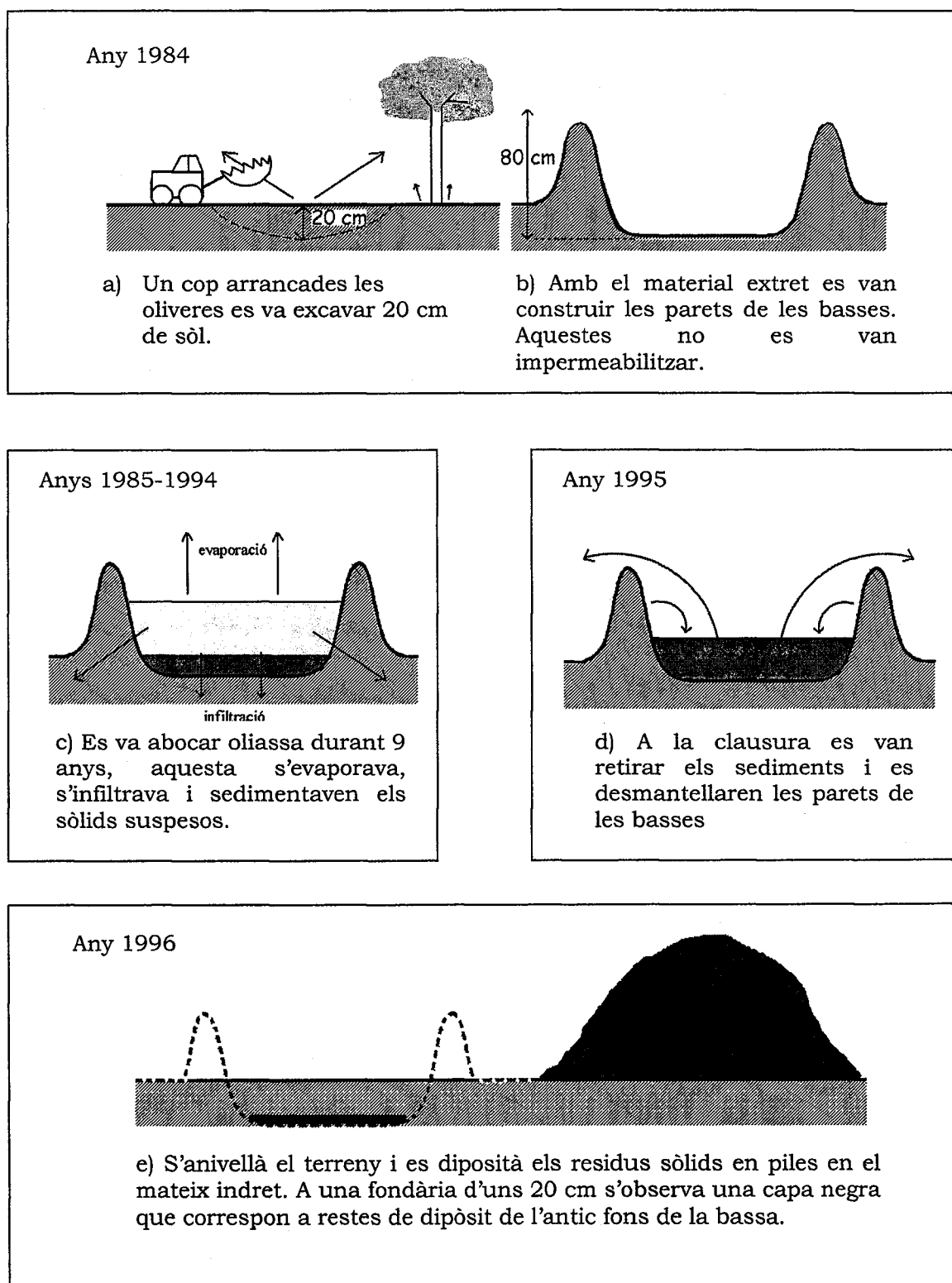


Figura 3.1.2. Esquema de la construcció i clausura de l'abocador d'oliassa.

Paral·lelament s'efectuaren altres perfils, l'un situat a un camp d'oliveres proper a l'abocador (per tant no afectat per l'aportació d'oliassa) el qual s'anomenà PERFIL CONTROL i l'altre en una zona intermitja entre una bassa longitudinal (s'observà la capeta de sediment) i el camí principal d'accés, amb la finalitat d'observar la possible infiltració lateral d'oliassa, aquest s'anomenà PERFIL TRANSEPTE. En la figura 3.1.3a s'indica la situació dels perfils descrits i en la taula 3.1.3 es pot observar la nomenclatura de referència i la fondària de tots els seus horitzons.

Finalment s'efectuaren tres perfils més (BL1, BL2 i BT, no descrits) i es prengueren mostres de la zona de les basses en cinc punts més a l'atzar i a diferents fondàries (per sobre i per sota de la resta del sediment d'oliassa) amb la finalitat de conèixer l'estat dels sòls quan feia un any que estava clausurat l'abocador (figura 3.1.3b i taula 3.1.3). Per a la realització dels perfils es disposà d'una retroexcavadora.

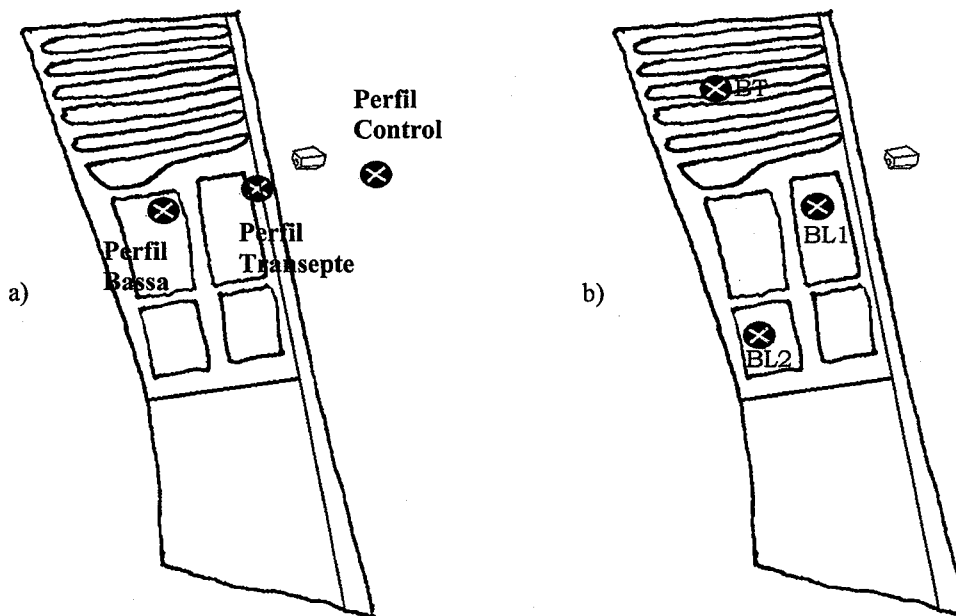


Figura 3.1.3. Situació aproximada dels perfils control, transepte, bassa (a) i altres tres perfils estudiats (b).

Taula 3.1.2. Nomenclatura de referència de les mostres dels tres perfils edafològics estudiats i fondària a la que correspon. (*) 35-46 cm correspon a un horitzó petrocàlcic no mostrejat.

Any 1996	Referència	Fondària (cm)
Perfil bassa		
	B1	0-50
	B2	50-90
	B3	90-125/140
Perfil transepte		
	T1	0-35*
	T2	45-65
	T3	65-110
	T4	110-140
Perfil control		
	C1	0-25
	C2	25-75
	C3	75-115
	C4	115-200

Taula 3.1.3. Nomenclatura de referència i fondària de les mostres de sòl obtingudes dels tres perfils no descrits.

Any 1996	Referència	Fondària (cm)	Observacions
Basses transversals			
	BT1	0-35	Mostra per sobre la capa residual
	BT2	35-125	Mostra per sota la capa residual
	BT3	125-150	
Basses longitudinals			
	BL1	35-80	Mostra per sota la capa residual
	BL2	35-80	Mostra per sota la capa residual

El **segon mostreig** es va efectuar l'any 1997, dos anys després de la clausura de l'abocador. S'efectuà un mostreig sistemàtic mitjançant una quadrícula regular de 20 m de malla (figura 3.1.4). S'agafaren mostres d'un total de deu punts, sis dels quals eren situats als vèrtex de la quadrícula a la zona de basses longitudinals i quatre a la zona de basses transversals. A cada punt es mostrejà sòls a dues fondàries, superficial (0-20cm) i subsuperficial (20-40cm), amb la finalitat de veure l'evolució de les característiques físico-químiques dels sòls per sobre la capa residual de material sedimentat (material aportat) i per sota (material pertanyent al sòl inicial). A la taula 3.1.4 s'indiquen les característiques de les diferents mostres.

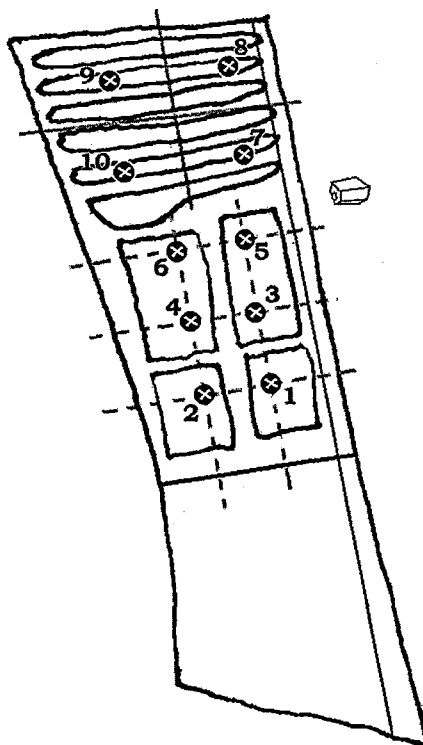


Figura 3.1.4. Situació aproximada dels punts de mostreig dos anys després de la clausura de l'abocador.

Taula 3.1.4. Nomenclatura de referència i fondària de les mostres de sòl obtingudes en el segon mostreig.

Any 1997	Referència	Fondària (cm)	Observacions
Basses longitudinals	1A97	0-20	Sòl molt compacte. Sembla que no hi havia hagut bassa. Absència de capa d'oliassa seca
	1B97	20-40	
	2A97	0-20	Terreny remogut d'aport a la clausura. No té restes d'oliassa seca.
	2B97	20-40	
	3A97	0-20	Materials més fins. Apareixen residus d'oliassa secs. Nòduls negres impregnats d'oliassa seca.
	3B97	20-40	
	4A97	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca.
	4B97	20-40	
	5A97	0-20	A 18 cm de fondària apareix la capa i d'oliassa seca.
	5B97	20-40	
6A97	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca.	
6B97	20-40		
Basses transversals	7A97	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca.
	7B97	20-40	
	8A97	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca.
	8B97	20-40	
	9A97	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca.
	9B97	20-40	
	10A97	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca.
	10B97	20-40	

El **tercer mostreig** es va efectuar l'any 2001, 6 anys després de la clausura de l'abocador. També es realitzà un mostreig sistemàtic amb una quadrícula regular de 20 m de malla (figura 3.1.5). S'agafarem mostres d'un total de 14 punts. A cada punt es mostrejaren sòls a dues fondàries, superficial (0-20 cm) i subsuperficial (20-40 cm). A la taula 3.1.5 s'indiquen les característiques de les diferents mostres.

Per a la realització del segon i tercer mostreig s'ha disposat d'un martell pneumàtic i sondes específiques per al mostreig de sòls.

Taula 3.1.5. Nomenclatura de referència i fondària de les mostres de sòl obtingudes en el tercer mostreig.

Any 2001	Referència	Fondària (cm)	Observacions
Basses longitudinals	1A01	0-20	Apareixen restes d'oliassa seca del fons de la bassa.
	1B01	20-40	
	2A01	0-20	Apareixen restes d'oliassa seca del fons de la bassa.
	2B01	20-40	
	3A01	0-20	Apareixen restes d'oliassa seca del fons de la bassa.
	3B01	20-40	
	4A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	4B01	20-40	
	5A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	5B01	20-40	
	6A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	6B01	20-40	
	7A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	7B01	20-40	
	8A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	8B01	20-40	
	9A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	9B01	20-40	
Basses transversals	10A01	0-20	Apareixen restes d'oliassa seca del fons de la bassa.
	10B01	20-40	
	11A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	11B01	20-40	
	12A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	12B01	20-40	
	13A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca
	13B01	20-40	
14A01	0-20	No apareixen restes d'oliassa seca	
14B01	20-40		

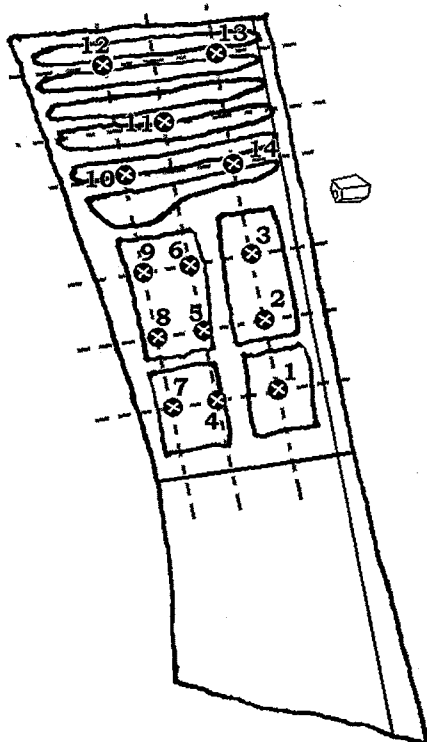


Figura 3.1.5. Situació dels punt de mostreig, sis anys després de la clausura de l'abocador.

3.1.2. Sòls considerats de referència

Per a establir el nivell base de compostos fenòlics presents en sòls, s'han mostrejat horitzons superficials (0-20 cm fondària) de sòls de tres zones oleícoles de Catalunya: el Baix Ebre-Montsià, el Baix Penedès i la Terra Alta. S'han recol·lectat sobretot sòls de conreu (olivera i d'altres) i alguns sòls forestals, en cap d'aquests sòls no se'ls ha aplicat mai oliassa (taula 3.1.6). Cada mostra està composta per 5 submostres.

Taula 3.1.6. Nomenclatura de referència de les mostres emprades per a establir nivells base de fenols, així com situació geogràfica, fondària i tipus de vegetació.

Ref.	Situació	Fondària (cm)	Observacions
Baix Ebre-Montsià			
NB1	Santa Bàrbara (Montsià)	0-20	Conreu d'olivera.
NB2	"	0-20	Conreu d'olivera, usen només adobs químics.
NB3	Sènia (Montsià)	0-20	Conreu d'olivera, entre oliveres.
NB4	"	0-20	Conreu d'olivera, sota les oliveres.
NB5	Entre la Sènia i Mas de Barberans	0-20	Sòl forestal, màquia litoral.
NB6	Mas de Barberans (Montsià)	0-20	Conreu d'ametllers.
NB7	"	0-20	Conreu d'olivera.
NB8	Entre Mas de Barberans i Tortosa	0-20	Conreu d'ametllers.
NB9	"	0-20	Conreu d'olivera.
NB10	Tortosa (Baix Ebre)	0-20	Conreu de garrofers
NB11	Camp Rodó (Baix Ebre)	0-20	Conreu d'olivera.
NB12	"	0-20	Conreu d'ametllers.
NB13	Deltebre (Baix Ebre)	0-20	Sòl forestal, màquia litoral.
NB14	"	0-20	Conreu d'olivera.
NB15	El Perelló (Baix Ebre)	0-20	Conreu d'ametllers.
NB16	"	0-20	Conreu d'olivera.
T	Santa Bàrbara (Montsià)	0-20	Conreu d'olivera.
Terra Alta			
NB17	Vilalba dels Arcs	0-20	Conreu d'olivera.
NB18	"	0-20	Sòl forestal, pineda.
NB19	"	0-20	Conreu d'olivera.
NB20	"	0-20	Conreu d'olivera
Baix Penedès			
NB21	S. Jaume dels Domenys	0-20	Conreu d'olivera
NB22	Llorenç del Penedès	0-20	Conreu de cereal.
NB23	La Bisbal del Penedès	0-20	Conreu d'ametllers.
NB24	Banyeres de Penedès	0-20	Conreu d'olivera
NB25	"	0-20	Sòl forestal, pineda.
NB26	"	0-20	Conreu de cereal.
NB27	Llorenç del Penedès	0-20	Conreu d'ametllers
NB28	"	0-20	Sòl forestal, pineda.
NB39	"	0-20	Conreu de cereals de més de 40 anys.
NB30	"	0-20	Conreu de vinya de 38 anys.
NB31	"	0-20	Sòl forestal, pineda.
NB32	"	0-20	Conreu d'olivera.
NB33	"	0-20	Conreu d'olivera.
Zones no oleícoles			
G	Collserola (Barcelonès)	0-20	Sòl forestal de roure, pi i alzina.
M	Vilassar de Dalt (Maresme)	0-20	Sòl forestal de pi i d'alzina

Per a estudiar els nivells de compostos fenòlics de sòls que han rebut oliassa, s'han mostregjat horitzons superficials (i subsuperficials) de camps de conreu que han rebut aportats d'oliassa a dosis agronòmiques. Cada mostra està

composada de 5 submostres. Aquests sòls (Taula 3.1.7) eren situats a Vilalba dels Arcs (Terra Alta) i Llorenç del Penedès (Baix Penedès). En el moment del mostreig feia com a mínim sis mesos que no se'ls aplicava oliassa.

Taula 3.1.7. Nomenclatura de referència de les mostres de sòls que han rebut oliassa com a fertilitzant, així com situació geogràfica, fondària, tipus de conreu i dosis aproximades.

Ref.	Situació	Fondària (cm)	Observacions
OA1	Vilalba dels Arcs (Terra Alta)	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa només una campanya a dosis aproximades de 50 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA2	"	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa només una campanya a dosis aproximades de 50 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA3	"	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa només una campanya a dosis aproximades de 50 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA4	"	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa durant 10 campanyes a dosis aproximades de 250 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA5	"	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa durant 10 campanyes a dosis aproximades de 250 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA6	"	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa durant 10 campanyes a dosis aproximades de 250 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA7	"	0-20	Conreu de vinya. S'hi ha aplicat oliassa durant 10 campanyes a dosis aproximades de 250 m ³ ha ⁻¹ i any.
OA8	Llorenç del Penedès (Baix Penedès)	0-20	Conreu d'olivera. S'hi ha aplicat oliassa durant 1 any.
OA9	"	0-20	Conreu d'olivera. S'hi ha aplicat oliassa durant 5 anys.
OA10	"	0-20	Conreu d'olivera. S'hi ha aplicat oliassa durant 10 campanyes. Dosis d'aport molt elevades al voltant de 350 m ³ ha ⁻¹ .

3.1.3. Sòls emprats per a simulacions en columnes lisimètriques

Per a l'experiment de simulació d'aplicació d'oliassa en columnes lisimètriques s'ha emprat l'horitzó A de dos sòls de naturalesa i característiques (químiques, físiques i fisico-químiques) diferents. El primer, és un sòl de conreu d'olivera representatiu dels sòls d'olivera de Catalunya, és de naturalesa calcària,

procedent de Santa Bàrbara (Montsià) i no se li ha aplicat mai oliassa. Segons la Soil Taxonomy es classifica coma Typic Xerorthent (USDA, 1998) i segons la FAO és un Regosol calcàric (FAO-UNESCO, 1990). Se li ha assignat com a nomenclatura de referència: Sòl **T**.

L'altre sòl emprat és un sòl forestal (pi i alzina) de naturalesa granítica, procedent de Vilassar de Dalt (Maresme), segons la Soil Taxonomy es classifica també com a Typic Xerorthent i segons la FAO com a Arenosol hàplic. Se li ha assignat com a nomenclatura de referència: Sòl **M**.

3.1.4. Sòls utilitzats en els estudis de degradació de fenols

Les mostres de sòls emprats han estat el **T** i **M** (ja descrits anteriorment) i el sòl **G** i **Tcont**.

El sòl **G** es caracteritza perquè es un sòl amb major activitat microbiana que el **T** i **M**. És una mostra d'horitzó A d'un sòl natural classificat com a un Lithic Xerochrept segons la Soil Taxonomy System (USDA, 1998) i com a Leptosol mòllic segons la FAO (FAO-UNESCO, 1998), i es troba a la reserva natural de la Font Groga, Serra de Collserola, al terme municipal de Sant Cugat del Vallès.

La mostra de sòl **Tcont** és una mostra de sòl preparada al laboratori. S'ha preparat emprant mostra de sòl **T** i afegint-li grans quantitats d'una mostra d'oliassa procedent de Vilalba dels Arcs (aproximadament una dosi de 1.500 m³ ha⁻¹), amb la finalitat d'obtenir al laboratori un sòl contaminat per estudiar quines són les condicions més adequades per al seu sanejament mitjançant la via biològica. Per aquest motiu s'ha avaluat quins efectes té l'aport de nutrients (**N** i **P**), la temperatura i la humitat sobre la degradació dels compostos fenòlics al sòl.

3.1.5. Sòls utilitzats per l'estudi de l'aplicació d'oliassa al camp

S'ha realitzat un experiment d'aplicació de diferents dosis d'oliassa al sòl en condicions de camp. S'han delimitat dotze parcel·les experimentals en un sòl (de naturalesa calcària i de característiques semblants al sòl T) ubicat a Llorenç del Penedès (Baix Penedès) que actualment s'utilitza pel conreu d'olivera. L'oliassa utilitzada prové de la depuradora d'oliasses del molí de CEOLPE (Centre Oleícola del Penedès). El criteri utilitzat per seleccionar aquesta oliassa ha estat la proximitat (uns 500 m) de la depuradora al camp experimental, la qual cosa va facilitar molt l'aport d'oliassa al sòl.

3.1.6. Oliasses

Per a la realització d'aquest treball s'han emprat dos tipus d'oliassa. La primera prové d'un molí tradicional de premsa situat a Vilalba dels Arcs (Terra Alta), que produeix anualment uns 200 m³ d'oliassa, que són emmagatzemats en un dipòsit per a la posterior aplicació sobre el terreny. La varietat principal d'oliva utilitzada és la farga. L'oliassa utilitzada és de la campanya 97-98, s'ha mantingut a una temperatura de 2-6°C i s'ha emprat per als següents experiments: proves d'extracció de fenols, en l'experiment de simulació en columnes lisimètriques, en l'estudi de degradació de fenols i per a la pròpia caracterització. La nomenclatura de referència usada és **OT**.

L'altra oliassa emprada prové de la depuradora d'oliasses del Centre Oleícola del Penedès i havia estat neutralitzada amb hidròxid sòdic. L'oliassa és generada en un molí de tres fases amb centrifuga contínua i és de la campanya 1999-2000. La producció anual d'oliassa és d'uns 4.500 m³. Aquest residu s'ha utilitzat per a l'experiment en parcel·les experimentals a Llorenç del Penedès i per a la pròpia caracterització. La nomenclatura de referència emprada és **OC**.

3.2. MÈTODES

3.2.1. Mètodes de caracterització

La majoria de mètodes utilitzats per determinar les propietats físiques, químiques i físico-químiques són els habitualment emprats en els laboratoris d'anàlisi de sòls (Page et al., 1982), excepte que s'indiqui una altra cosa.

3.2.1.1. Preparació i conservació de les mostres

Les mostres de sòl utilitzades han estat tamisades a 2 mm de llum. Una part s'ha conservat a la nevera, a la humitat existent en el moment del mostreig en bosses tancades hermèticament, per evitar pèrdues de compostos fenòlics i alteracions de l'activitat biològica. Les mostres emmagatzemades en frigorífic s'han utilitzat per analitzar els compostos fenòlics, els nitrats i determinar l'índex de germinació. L'altra part s'ha assecat a l'aire per a la posterior anàlisi d'altres paràmetres habituals en sòls.

Les mostres d'oliasses s'han conservat a 4°C i els lixiviats procedents dels experiments en columnes lisimètriques s'han conservat a -20°C, fins el moment de les anàlisis corresponents.

3.2.1.2. Anàlisi mineralògica

Anàlisi mineralògica: s'ha realitzat l'estudi de la mineralogia dels sòls mitjançant difracció de raig-X en mostra polvoritzada. En el cas del pòsit orgànic sedimentat a partir de l'oliassa en l'abocador (mostra B1) prèviament s'ha calcinat a 450°C per a eliminar la matèria orgànica. Per això s'ha utilitzat un difractòmetre de geometria Bragg-Brentano ($\theta/2\theta$) marca SIEMENS D 500 amb monocromador de grafit i detector de centelleig NaI (TI), utilitzant radiació de Cu K α (1,541Å).

3.2.1.3. Propietats físiques

Anàlisi textural: mètode de la pipeta Robinson basat en la velocitat de sedimentació segons la llei de Stokes, per les fraccions inferiors a 20 µm, i separació per via humida mitjançant tamisos de les fraccions superiors, de manera que s'aconsegueixi distribuir les partícules en els següents intervals: 2000-200 µm; 200-20 µm; 20-2 µm i < 2 µm. Prèviament a la separació s'ha eliminat la matèria orgànica amb peròxid d'hidrogen i s'ha dispersat la fracció col·loidal agitant la mostra durant 12 hores en presència d'un agent dispersant (hexametafosfat sòdic). S'ha aplicat per a l'anàlisi de mostres de sòl.

Conductivitat hidràulica: determinació de la constant K en medi saturat, basant-se en la llei de Darcy. S'ha aplicat per a calcular la permeabilitat de les mostres de sòl en l'experiment de simulació en columnes lisimètriques.

Retenció hídrica a capacitat de camp: pel mètode d'extracció a pressió a través de membrana de Richards. Les determinacions s'han dut a terme mesurant l'aigua retinguda per les mostres de sòl, prèviament saturades, sotmeses a la pressió atmosfèrica durant 24 hores, deixant drenar l'aigua lliurement.

3.2.1.4. Propietats fisico-químiques, químiques i biològiques

pH i conductivitat elèctrica: han estat determinats, en el cas de les mostres de sòls, en un extracte aquós en proporció 1:2,5 (p:v) obtingut després d'una hora d'agitació mecànica i posterior filtració mitjançant paper de filtre Whatman n°42. En el cas dels llixiviats procedents dels assajos en columnes lisimètriques i de les mostres d'oliassa únicament s'han filtrat. La mesura del pH s'ha fet per potenciometria amb un pHmetre Crison, model MicropH 2002. La conductivitat elèctrica s'ha mesurat també per potenciometria amb un conductímetre Crison model 525. Els valors de conductivitat s'han expressat sempre en dS m⁻¹ i referits a 25°C.

Carbonats: determinats mitjançant volumetria de CO_2 després en atacar les mostres amb HCl 1:1 segons el mètode del Calcímetre Bernard. Mètode emprat únicament per a sòls.

Capacitat d'intercanvi catiònic: en primer lloc s'ha desorbit i saturat les mostres amb acetat amònic 1 N a pH 7, s'ha rentat l'excés d'ió saturant amb etanol, s'ha desplaçat l'ió saturant amb NaCl acidulat amb HCl 2N i s'ha determinat l'amoni desplaçat en medi bàsic per destil·lació i (Soil Survey Laboratory Staff, 1992). Mètode emprat per a l'anàlisi de mostres de sòls.

Cations assimilables: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} presents en un extracte de les mostres de sòl en acetat amònic 1N a pH 7, en proporció 1:20 (p:v). Na^+ i K^+ es determinen per fotometria de flama i Ca^{2+} i Mg^{2+} per complexometria amb EDTA 0,02N.

Anions i cations solubles: s'han determinat mitjançant cromatografia iònica (Dionex D-300) en un extracte aquós de les mostres de sòl en proporció 1:10 (p/v) obtingut després d'una hora d'agitació mecànica i en el cas de les oliasses i lixiviats s'han determinat directament prèvia filtració i dilució si s'escau. La fase mòbil de l'anàlisi d'anions consta d'una solució de carbonat sòdic 2 mM amb bicarbonat sòdic 0,75 mM, mentre que la de cations està formada per àcid metasulfònic 0,02M.

Matèria orgànica: es determina la matèria orgànica total per calcinació en mufla a 560°C i la oxidable mitjançant oxidació per via humida amb $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N en medi sulfúric, segons el mètode de Walkey-Black. Ambdós mètodes s'han emprat per a sòls i en el cas de les oliasses únicament s'ha determinat el carboni oxidable.

Nitrogen total: nitrogen orgànic i amoniacal pel mètode Kjeldahl, prèvia digestió catalitzada en medi sulfúric concentrat i calent (410°C) i posterior determinació del'amoníac destil·lat en medi bàsic (NaOH 30%) i recollit sobre una solució d'àcid bòric 0,02N que és valorada amb àcid sulfúric 0,25N. Mètode emprat per a l'anàlisi de mostres de sòls i oliasses.

Fòsfor assimilable: colorimetria de reducció d'un heteropoliàcid fosfo-molibdic a partir d'una solució prèviament extractada, segons els mètodes Osmond Bray per a sòls àcids i Olsen-Watanabe per a sòls bàsics. En el cas del mètode d'Osmond Bray s'usa com a extractants el fluorur amònic 0,03N i l'àcid clorhídric 0,1N i en el del mètode Olsen s'empra bicarbonat sòdic 0,5M a pH 8,5.

Demanda química d'oxigen: consisteix en l'oxidació del carboni orgànic dels lixiviats o d'oliasses amb dicromat potàssic 0,25N en medi àcid. L'excés d'oxidant es valora amb sulfat ferrós amònic 0,025N (sal de Mohr), i la quantitat de C orgànic oxidat es calcula a partir de la quantitat de Cr⁶⁺ reduït. Emprat per a l'anàlisi d'oliasses i lixiviats.

Matèria seca: per gravimetria del residu assecant a 105°C fins a pes constant. Utilitzat per a l'anàlisi de les oliasses.

Sòlids en suspensió: anàlisi gravimètrica després de filtrar les oliasses per 0,47 µm de porus.

Isoterma d'adsorció: es posen en contacte diferents dilucions d'oliassa i sòl en proporció 1:10 (p/v) i s'agita durant un hora a 25°C. Es valora el contingut de fenols inicials i finals de la solució en equilibri. Les dilucions d'oliassa utilitzades han estat les següents: oliassa al 100%, al 75%, al 50%, al 25%, al 10%, a l'1% i al 0.1%. Es determina la constant de distribució (K_d) per quantificar l'afinitat dels fenols de l'oliassa pels sòls.

Coefficient de distribució octanol/aigua (K_{ow}): s'efectua una extracció líquid-líquid d'un volum d'oliassa amb octanol en proporció 1:1 (v:v) en un embut de decantació, després d'agitar i deixar en contacte 15 minuts. Es valoren colorimètricament els fenols (mètode de Folin Ciocalteau) de la fase aquosa (oliassa) abans i després del contacte amb el dissolvent. Per diferència s'obté la fracció que es desplaça a la fase orgànica. El K_{ow} és el quocient entre la concentració de fenols que ha passat a la fase octanol i la concentració de fenols a la fase aquosa en l'equilibri.

Extracció de compostos fenòlics: per a l'extracció de compostos fenòlics procedents de l'oliassa en sòls s'han utilitzat diferents extractants: aigua (temperatura ambient) i calenta (100°C), aigua a 100 i 170°C en forn de microones, sulfat sòdic 1N, sulfat magnèsic 0,5N, oxalat sòdic 0,5N, oxalat sòdic 0,5N+sulfat sòdic 1N (2:1), pirofosfat sòdic 0,4N, tartrat sòdic 1N, hidròxid sòdic 2N, hidròxid sòdic 2N a 170°C, pirofosfat 0,4N+hidròxid sòdic 0,1N, metanol, metanol+aigua (1:1), acetat d'etil, xilè, ciclohexà i clorur de metilè+acetona (1:1).

Les extraccions s'han efectuat en proporció sòl:extractant 1:10 (p:v) agitant durant 12h i a temperatura ambient, excepte pels casos que s'ha fet a temperatura més elevada en que el temps d'extracció ha estat d'una hora i en el cas de l'extracció amb clorur de metilè i acetona s'ha efectuat segons el mètode 3550 de la EPA (EPA, 1986). En aquest mètode es substitueix l'agitació per l'extracció mitjançant ultrasons, durant deu minuts.

També s'ha estudiat l'efecte en l'extracció de diferents proporcions sòl:extractant (1:5, 1:10 i 1:25) i s'ha comparat l'efectivitat de l'extracció emprant com a mètode d'extracció l'agitació durant 12 h versus l'extracció amb ultrasons durant deu minuts. Aplicat únicament per a alguns extractants concrets.

En les extraccions on s'utilitza l'hidròxid sòdic com a extractant, l'agitació s'ha efectuat en atmosfera inert d'heli, per evitar l'oxidació dels compostos fenòlics extractats.

En el cas de les extraccions amb dissolvents orgànics, un cop feta l'extracció s'ha procedit a evaporar el dissolvent en un rotavapor, en absència d'oxigen, de llum i a 40°C de temperatura màxima. Un cop evaporat el dissolvent s'ha resuspès el residu amb metanol i s'ha procedit a l'anàlisi de compostos fenòlics tal i com s'indica tot seguit.

Anàlisi de compostos fenòlics: els compostos fenòlics de l'oliassa, lixiviats i extractes de sòls, s'analitzen en medi aquós mitjançant el mètode colorimètric de Folin-Ciocalteu (Box, 1983). A l'extracte a analitzar s'addicionen 2 ml de reactiu de Folin-Ciocalteu i 6 ml d'una solució de Na₂CO₃ al 20%

s'addicionen. Es manté la mostra a la foscor per al desenvolupament del color durant un mínim d'una hora, s'enrasa el matràs a 50 ml i es mesura l'absorbància en un espectrofotòmetre a una λ de 765 nm. La recta de calibrat es realitza amb patrons d'àcid cafeic (o-difenol).

Tractament de les mostres prèvia identificació dels compostos fenòlics: per tal de millorar la detecció dels compostos fenòlics s'han realitzat diferents tractaments previs de les mostres. En qualsevol cas, s'ha partit de l'extracció del sòl amb aigua en proporció 1:10 (p:v) mitjançant agitació durant una nit. En un cas la mostra es sotmet únicament a processos de concentració i purificació. En l'altre a més es sotmet a una oxidació lleu amb hidròxid sòdic, òxid de coure i sal de Mohr tal com descriuen Kögel i Botcher (1985) però aplicat a un líquid, amb l'objectiu de despolimeritzar els compostos fenòlics polimèrics presents. En base a aquesta reacció s'han realitzat també diverses modificacions.

1er cas: Sobre un extracte aquós de sòl filtrat a través d'un filtre de membrana de 0,47 μm de porus, s'acidifica lentament fins a aconseguir un pH al voltant de 3 (no s'acidifica més per evitar la formació de precipitats). Un cop acidificat, es fa passar per una columna d'extracció en fase sòlida del tipus tC18 (prèviament condicionada amb metanol i aigua destil·lada). Els compostos fenòlics queden majoritàriament retinguts en el reblliment de la columna. Per a desorbir-los s'ha emprat acetat d'etil. Posteriorment s'evapora el solvent en atmosfera inert (Heli o Nitrogen) i es resuspèn amb uns mil·lilitres de metanol.

2on cas: A 200 ml d'extracte aquós de sòl filtrat s'hi afegeix 16 g d'hidròxid sòdic, 500 mg de sal de Mohr ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) i 2,5 g d'òxid de coure. Es calenta durant dues hores a 170°C en atmosfera de nitrogen. Un cop efectuat l'atac es refreda i es centrifuga durant 25 minuts a 3000 r.p.m. El sobrenedant es guarda i s'acidifica fins a pH 2 amb HCl 6N i es deixa en repòs durant 1 hora. Es centrifuga de nou i es recull el sobrenedant. El precipitat es renta amb aigua acidulada amb HCl al 0,1% i es torna a centrifugar. Es reuneixen els sobrenedants i es condicionen els cartutxs tC18 amb 2 ml de metanol i 4 ml d'aigua. S'assequen les columnes amb nitrogen i s'hi fan passar lentament els sobrenedants. S'assequen els cartutxs amb corrent de nitrogen i

s'hi fa passar 4 volums d'1 ml d'acetat d'etil. L'acetat d'etil s'evapora amb corrent de nitrogen i es redissol el residu amb 5 ml de metanol.

Aquest mateix atac s'ha realitzat de tres formes diferents, modificant alguns reactius:

- Oxidació més forta que l'anterior, amb 16 g d'hidròxid sòdic i 2,5 g d'òxid de coure.
- Només amb hidròlisi bàsica, amb 16 g d'hidròxid sòdic.
- Hidròlisi àcida amb àcid sulfúric 2N.

En qualsevol cas, els extractes metanòlics es conserven en vials de vidre de color topazi a -20°C . En cas de que s'injecti al HPLC convé diluir la mostra amb aigua destil·lada fins a obtenir menys d'un 50% de metanol.

Identificació de compostos fenòlics: Per a la identificació de compostos fenòlics tant en extractes de mostres de sòls com d'oliassa, s'han emprat diferents equips cromatogràfics en diferents condicions de treball que s'indiquen a continuació.

- Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC-UV):

S'ha emprat com a sistema de bombeig un cromatògraf marca Dionex DX-300 acoblat a un espectrofotòmetre UV-Visible, Kontron HPLC detector 335. La separació es dugué a terme mitjançant una columna cromatogràfica tipus C_{18} : Kromasil 100, de 5 μm de diàmetre de partícula i 250 mm de llargària per 4 mm d'amplada i una pre-columna C_{18} de 20 mm de llargària i 4 mm d'amplada. El volum de mostra injectat és de 10 μL . S'han emprat les condicions de treball proposades per Burtscher et al. (1982) per a la identificació de fenols naturals i que s'indiquen a continuació:

- Temperatura de la columna: 50°C .
- λ 280 nm.
- flux $0,8 \text{ ml min}^{-1}$.

- Gradient:

Temps (minuts)	Fase mòbil	
	A (%)	B (%)
0	95	5
45	50	50
50	30	70
60	30	70
70	95	5

Fase mòbil A: Tampó fosfat KH_2PO_4 0,01M a pH 2.

Fase mòbil B: Acetonitril.

- Cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a un detector de masses (HPLC-MS)

S'ha emprat un equip de cromatografia líquida marca LKB Pharmacia model 2520 amb injector automàtic Hewlett-Packard 1050. La separació es va efectuar amb la mateixa columna que la de l'apartat anterior. El volum de mostra injectat és de 100 μL . La composició de la fase mòbil, condicions i gradient es mostren a continuació:

- Temperatura de la columna: 50°C.

- λ 280 nm.

- flux 1 ml min^{-1} .

- Gradient:

Temps (minuts)	Fase mòbil	
	A (%)	B (%)
0	95	5
25	50	50
40	20	80
45	0	100
50	95	5

Fase mòbil A: aigua + àcid fòrmic 0,1% a pH 2,75.

Fase mòbil B: Acetonitril + àcid fòrmic 0,1%.

No s'ha utilitzat la mateixa fase mòbil que en HPLC-UV perquè les solucions tampó inorgàniques són incompatibles amb els detector de masses actuals. La detecció de masses es va efectuar amb un equip VG Platform II (Fisons Instruments) acoblat a un sistema d'ionització química a pressió atmosfèrica APCI (atmospheric pressure chemical ionization), usant nitrogen com a gas nebulitzant calentat a 150°C i introduït a la regió capil·lar a un flux de 400 L h^{-1} . El capil·lar es troba a una temperatura de 400°C i el voltatge de la corona es va mantenir a - 3,26 kV i el d'extracció a -25 V. L'interval de masses moleculars detectades és de 90-500 uma.

- Cromatografia de gasos acoblada a un detector de masses (GC-MS)

Les anàlisis s'han dut a terme en un cromatògraf de gasos Carlo Erba GC 8000 Top acoblat a un espectròmetre de masses d'impacte electrònic MD 800 (Fisons). Les condicions analítiques són:

- Columna Innowax, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, farcida de poliglicols, adequada per a substàncies polars.
- Temperatura de l'injector 250°C. Injecció d'1 µL en mode splitless durant 40 segons.
- El gradient de temperatura emprat es mostra a continuació:

Temps (minuts)	Temperatura °C
0	50
1	50
9	150
10	150
28	260
48	260

Pel que fa al detector de masses, la temperatura de la font d'ions s'ha mantingut a 200°C i la de la interfase a 250°C. L'interval de masses moleculars detectades és de 45-450 uma. Voltatge d'ionització -70 kV.

Test de germinació: assaig en el qual es mesura el número de llavors germinades i la longitud de les arrels de 10 llavors de *Lactuca sativa* dipositades en una placa de petri de 9 cm de diàmetre sobre un filtre Whatman núm. 1 i humitejades amb 5 ml d'un extracte aquós de sòl en proporció 1:1 (p/v) o el lixiviat recollit en l'experiment en columnes lisimètriques. El temps de contacte indicat en la de la tècnica original és de 3 dies a la foscor i a 25 °C, però en aquest cas s'ha prolongat fins a 6 per assegurar la germinació. L'índex de germinació es va calcular d'acord amb la següent fórmula (Zucconi et al., 1981):

$$IG (\%) = \frac{(\% \text{ de llavors germinades }) \times (\text{longitud de les arrels})_{\text{sòl contaminat}} \times 100 /}{(\% \text{ de llavors germinades }) \times (\text{longitud de les arrels})_{\text{sòl control}}}$$

3.2.2. Assajos de simulació en columnes lisimètriques

Amb la finalitat de veure els efectes de l'aplicació d'oliassa al sòl, s'han realitzat assajos de simulació en columnes lisimètriques. L'experiment s'ha realitzat en un conjunt de 16 columnes de metacrilat d'un metre d'alçada i 10 cm de diàmetre interior. La meitat de les columnes es van omplir amb mostra de sòl **T** i l'altra meitat amb mostra de sòl **M**. Les mostres de sòls prèviament havien estat tamisades a 1 cm de diàmetre. A la part inferior de les columnes s'hi va col·locar una malla i geotèxtil per impedir la sortida del material edàfic. Les columnes es van omplir fins a una alçada de 90 cm, deixant a la part superior 10 cm lliures per a facilitar la manipulació de les columnes (aplicació de l'oliassa, homogeneïtzació, etc.).

El protocol experimental seguit ha estat el següent: Periòdicament s'han efectuat aplicacions d'oliassa **OT** a les columnes prèviament preparades. Les dosis d'aportació d'oliassa equivalen a **30, 180 i 360 m³ ha⁻¹**. La dosi de 30 m³ ha⁻¹ és la dosi màxima permesa per les autoritats catalanes (Decret 290/1994), per a usar-la en profit de l'agricultura. A la pràctica aquesta normativa s'incompleix en molts casos i s'aporten dosis força superiors (al voltant de 150-200 m³ ha⁻¹) i fins i tot de vegades s'inunden els camps assolint-se valors que poden estar al voltant dels 360 m³ ha⁻¹. Les dosis de 180 i 360 són prou superiors a la dosi màxima permesa (6 i 12 vegades més) per a detectar possibles impactes negatius sobre el sòl. L'aportació de dosis superiors s'ha considerat que estan fora l'àmbit agronòmic. Tots els tractaments s'han efectuat per duplicat i s'han inclòs **sòls control**, sense cap addició d'oliassa (dosi 0).

Després de cada aplicació d'oliassa i un cop infiltrada (passats 2-3 dies), s'han voltejat els primers 20 cm per simular un llaurat. Al cap de 15 dies s'ha simulat un període de pluja, utilitzant aigua destil·lada en un volum equivalent a una precipitació efectiva de 168 mm. La quantitat d'aigua emprada correspon aproximadament a la pluja efectiva infiltrada durant el període humit d'un any (precipitació-evapotranspiració) en la zona oleícola del Montsià. A continuació es van recollir els **lixiviats** de cada columna i aquestes es deixaren en repòs durant un període de 15 dies per a que s'assequessin. Un cop seques, es tornà a començar el cicle de nou. El cicle s'ha repetit fins un

total de 8 aplicacions d'oliassa i 8 aplicacions de "pluja" recollint els corresponents lixiviats. Un cop completats els 8 cicles s'ha procedit a desmuntar les columnes separant quatre **fraccions de sòl** de 0-20, de 20-40, de 40-60 i de 60-90 cm de fondària, per la posterior anàlisi (figura 3.2.1).

Durant l'assaig les columnes s'han mantingut en una cambra fosca i a una temperatura entre 18 i 23°C.

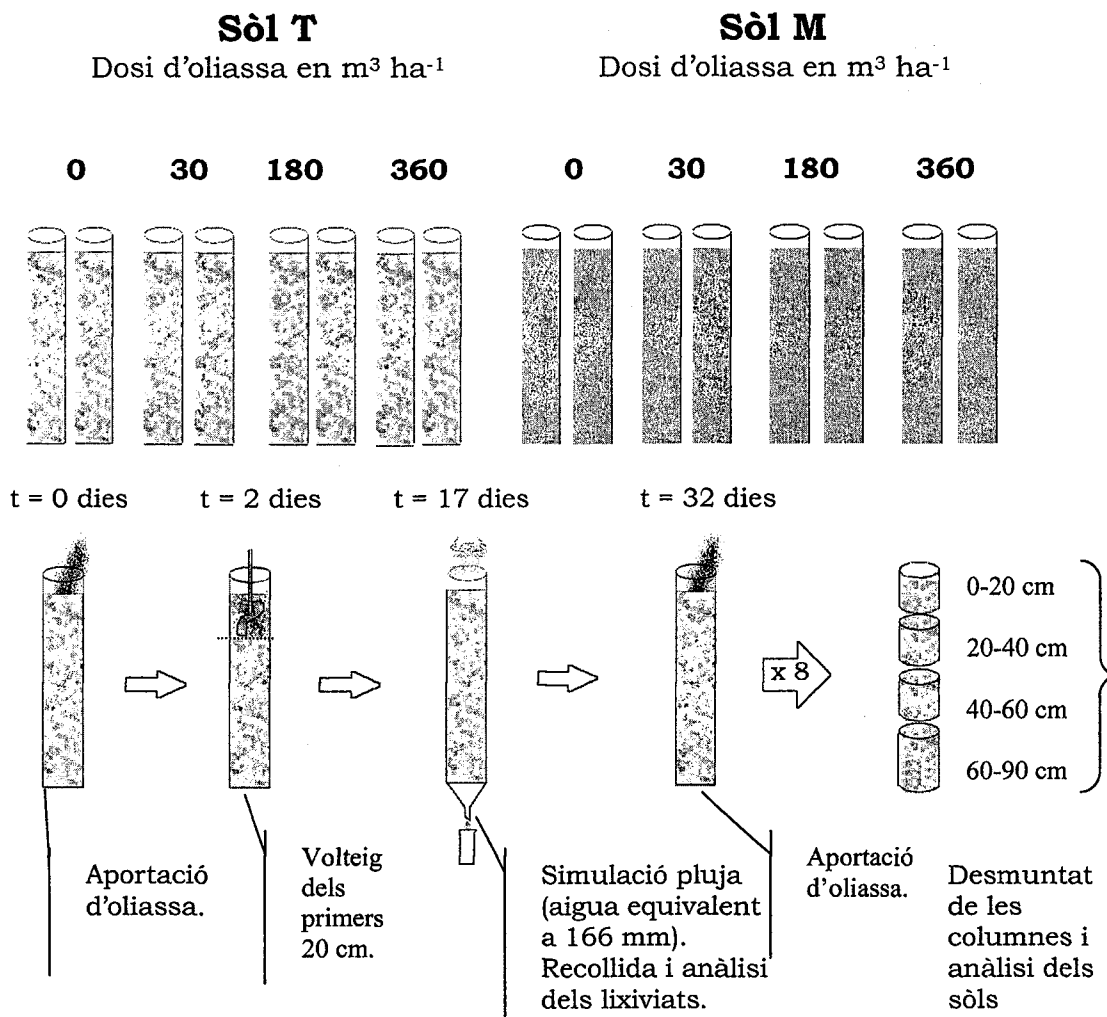


Figura 3.2.1. Protocol experimental de l'experiment en columnes lisimètriques.

Els paràmetres analitzats de cadascun dels **lixiviats** són: pH, conductivitat elèctrica, demanda química d'oxigen, calci, magnesi, potassi, sodi, fosfats, nitrats, fenols i índex de germinació.

Els paràmetres analitzats de les mostres de **sòl** un cop desmuntades les columnes són: pH actual i potencial, conductivitat elèctrica, carbonats, carboni oxidable, nitrogen Kjeldahl, fòsfor assimilable, cations assimilables, nitrats i, fenols solubles i extractats amb hidròxid sòdic 0,1N amb pirofosfat sòdic 0,4N.

3.2.3. Assajos de respirometria i biodegradació de fenols

Els experiments respiromètrics i d'incubació s'han realitzat per a avaluar la influència de l'aport d'oliassa sobre l'activitat biològica del sòl i la biodegradabilitat dels compostos fenòlics de l'oliassa. Aquests experiments s'han realitzat amb el següent equipament:

1. Respiròmetre tradicional discontinu, amb el qual es valora el CO_2 després durant la mineralització de la matèria orgànica per part del microorganismes heteròtrofs (Anderson, 1982). El CO_2 després es fixa sobre una solució d'hidròxid sòdic 0,5N en forma de carbonat, que posteriorment es precipita amb BaCl_2 10%. L'excés de NaOH es valora per volumetria àcid-base amb HCl 0,05N en presència de fenoftaleïna com a indicador. Les mostres de sòl es mantenen en un recipient hermètic de 3 L de capacitat, amb un recipient amb 25 ml d'hidròxid sòdic 0,5N i un altre amb aigua destil·lada per mantenir la humitat.
2. Respiròmetre electrolític continu BI-1000 Respirometric System (Bioscience, Inc.), amb el qual es valora l' O_2 consumit pels microorganismes aeròbics o altres processos d'oxidació. Consisteix en un bany termostatat amb vuit reactors individuals tancats. Cada reactor conté un flascó de 500 ml de volum amb un tap que disposa d'un petit recipient amb una solució de KOH, una cèl·lula electrolítica que conté H_2SO_4 1N com a electrolít i dos elèctrodes. El CO_2 després pels microorganismes és fixat per la solució de KOH, creant una pressió negativa al flascó respecte la pressió externa, causant una davallada del nivell d'electrolít amb la qual cosa deixa d'haver contacte entre l'elèctrode i l'electrolít, provocant que la cèl·lula s'activi. Un cop aquesta s'activa, un corrent elèctric passa a través dels dos elèctrodes submergits i hidrolitza l'aigua de la solució d'electrolít generant oxigen i hidrogen. La producció d' O_2 és enregistrada de forma automàtica i contínua per un PC a intervals de temps determinats (6h).
3. Incubacions (sense control de l'activitat respiratòria), únicament es controlen les condicions ambientals i es quantifiquen els fenols de la mostra a diferents temps d'incubació. La finalitat d'aquest tipus d'incubació és estudiar l'evolució dels compostos fenòlics i no de l'activitat respiromètrica.

Tots aquests experiments s'han realitzat en condicions controlades òptimes per afavorir l'activitat microbiana del sòl. Les condicions de treball han estat les següents: s'ha emprat l'equivalent a 25 g de sòl sec (sòl o barreja sòl residu) i se li ha afegit l'aigua necessària per assolir la humitat equivalent al 50% de la capacitat de camp del sòl, a 30° C de temperatura i a la foscor. En algun experiment en què es volia estudiar l'efecte de la humitat o temperatura sobre la biodegradabilitat en el sòl, aquests paràmetres s'han variat. El temps de les incubacions ha estat variable, segons cada experiment, la durada ha estat entre els 15, 30 i 180 dies.

A les mostres de **sòls T, M i G** se'ls ha afegit diferents dosis d'**oliassa OT, O (control), 30, 180 i 360 m³ ha⁻¹** i s'han efectuat diferents experiments d'incubació i de respirometria, tant amb mostra esterilitzada com no, per estudiar l'efecte de l'activitat microbiana en la biodegradació dels compostos fenòlics de l'oliassa.

S'han realitzat un sèrie d'assajos respiromètrics amb un sòl contaminat al laboratori amb oliassa (**Tcont**) per avaluar l'activitat biològica dels sòls fortament contaminats, així com la biodegradabilitat dels compostos fenòlics en diferents condicions d'humitat, temperatura, relació C/N i relació C/P.

3.2.4. Estudi dels efectes de l'aplicació d'oliassa al camp

Un total de dotze parcel·les, situades al municipi de Llorenç del Penedès (Baix Penedès) de 3x2 m² cada una es van delimitar i es va voltejar la part superficial (0-20 cm) amb un motocultor i posteriorment van ser anivellades.

En l'experiment de camp s'efectuà l'aport d'oliassa procedent de la depuradora esmentada (referència OC) mitjançant un sistema de reg a manta a dosis equivalents a 30, 180 i 360 m³ ha⁻¹. Cada un dels tractaments es va realitzar per triplicat i es reservaren tres parcel·les control, sense aport d'oliassa (figura 3.2.2), el que suposa dotze parcel·les experimentals.

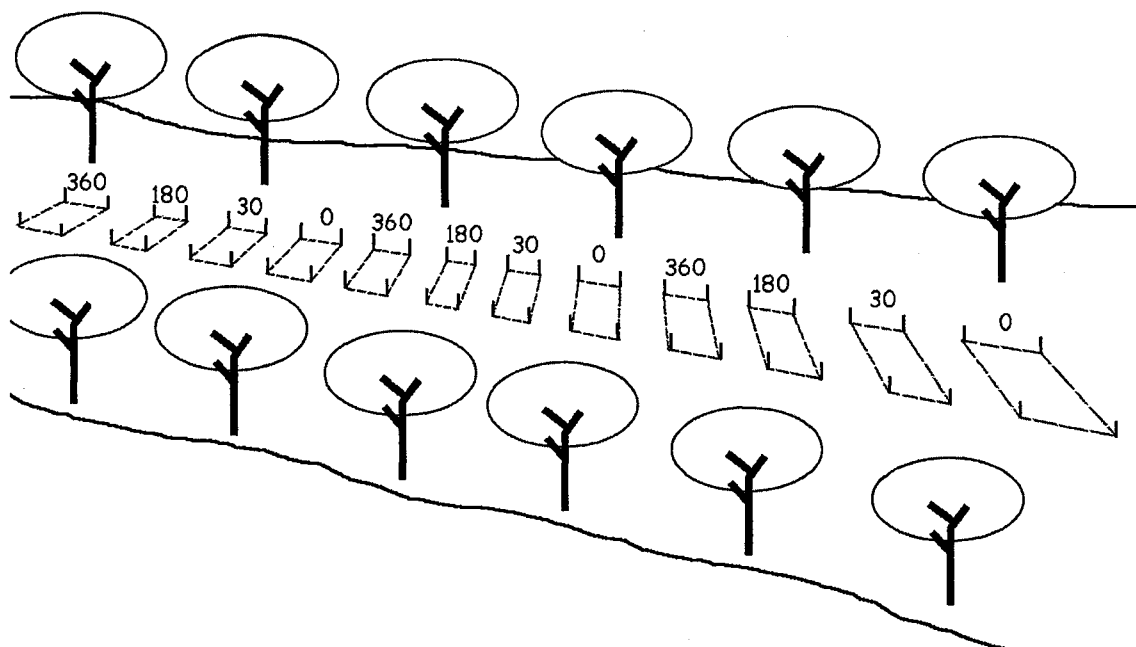


Figura 3.2.2. Esquema de la situació les dotze parcel·les experimentals emprades. Els números indiquen la dosi d'oliassa ($m^3 ha^{-1}$) aplicada en cada cas.

Al cap de nou dies, un cop infiltrada l'oliassa, es voltejà de nou la part superficial a fi de distribuir homogèniament l'oliassa en el sòl.

Les diferents parcel·les es mostrejaren a una fondària de 0-20 cm, a cada parcel·la es va prendre una mostra composta constituïda per 4 submostres que posteriorment foren mesclades i homogeneïtzades. Els mostrejos es van efectuar a diferents temps: 0, 3, 9, 15, 30, 60 i 120 dies després de l'aport d'oliassa.

Els paràmetres analitzats dels quals s'ha seguit l'evolució en el temps són: pH actual i potencial, conductivitat elèctrica, carboni oxidable, nitrogen total Kjeldahl, fòsfor assimilable, cations i amoni intercanviables, nitrats i fenols (solubles i extractats amb hidròxid sòdic 0,1N i pirofosfat sòdic 0,4N).

3.2.5. Tractament estadístic

La majoria dels resultats obtinguts en aquesta memòria s'han avaluat estadísticament mitjançant l'anàlisi de la variança i posteriorment s'han extret els grups homogenis mitjançant la prova de Tuckey amb un interval de confiança del 95%.