



**Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Tesis Doctoral**

**Disminución de la fitotoxicidad del alpeorujo seco y
extractado por hongos saprobios y arbusculares**

**M^a Inmaculada Sampedro Quesada
2005**

**Disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó seco y extractado por
hongos saprobios y arbusculares**

Memoria que presenta la Licenciada en
Farmacia M^a Inmaculada Sampedro Quesada
para aspirar al grado de Doctora

Fdo: M^a Inmaculada Sampedro Quesada

V^o B^o

Los Directores

Fdo: D^o. Juan Antonio Ocampo Bote
Doctor en Ciencias Biológicas
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Fdo: D^a. Inmaculada García Romera
Doctora en Ciencias Biológicas
Científico titular del C.S.I.C.

Universidad de Granada

2005

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Microorganismos rizosféricos que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal, del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. Durante el período de disfrute de la beca se realizaron dos estancias breves en la Universidad de la Tuscia (Italia) y en el Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) (Sevilla).

Parte de los resultados presentados en esta tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

Martín, J., Sampedro, I., García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) in presence of olive mill dry residues. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 1769-1775.

Sampedro, I., Aranda, E., Martín, J., García-Garrido, J.M., García-Romera, I., Ocampo, J.A. 2004. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology*. 26:149-156.

Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J.A, Brenes, M., García-Romera, I. 2004. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4487-4492.

Sampedro, I., Ocampo, J.A., García-Romera, I., D'Annibale, A. Bioconversion of olive-mill dry residue by *F.lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* (En prensa).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- XVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología (Alicante, septiembre de 2001).
- I Conferencia Mundial de Olivar Ecológico, Promociones y Cultura (Jaén, mayo de 2002).
- Biotec 2004. Congreso Nacional de Biotecnología (Oviedo, julio de 2004).
- XXII International Conference on Polyphenols (Helsinki, Finlandia, agosto de 2004).
- XI International Conference of the FAO ESCORENA Network on Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture (Murcia, octubre de 2004).

Indice

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. Agricultura industrializada.....	1
2. Agricultura ecológica.....	2
3. Importancia de microorganismos rizosféricos en agricultura.....	4
3.1. Conceptos generales.....	4
3.2. Micorrizas.....	5
a) Generalidades.....	5
b) Formación de la simbiosis.....	6
c) Fisiología de las micorrizas.....	7
d) Ecología de las micorrizas.....	8
e) Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos rizosféricos.....	10
f) Micorrizas y residuos agroindustriales.....	10
3.3. Rhizobium.....	10
4. Actividades enzimáticas como índice de actividad biológica del suelo.....	12
4.1. Actividad β -glucosidasa.....	12
4.2. Actividad fosfatasa.....	13
4.3. Otros índices: contabilización microbiológica, pruebas moleculares.....	13
5. El olivo.....	14
5.1. Historia del olivo.....	14
5.2. La olivicultura española.....	15
5.3. Producción de aceite de oliva.....	16
5.4. Procesos de obtención del aceite de oliva.....	17
5.4.1. Recepción y selección.....	17
5.4.2. Limpieza, lavado y pesada.....	18
5.4.3. Molienda.....	18
5.4.4. Batido.....	18
5.4.5. Extracción.....	18
a) Extracción por presión.....	19
b) Extracción por centrifugación.....	19

5.4.6. Almacenamiento.....	22
5.5. Aprovechamiento integral de subproductos de la agroindustria del olivar.....	23
5.5.1. Residuos de la agroindustria del olivar.....	23
5.5.2. Residuos del olivo.....	23
5.5.3. Residuos derivados de la tecnología de extracción del aceite de oliva.....	23
Aguas de lavado.....	23
Alpechín.....	24
Orujos y alpeorujos.....	25
Otros residuos.....	29
6. Transformación de alpeorujo seco y extractado.....	29
6.1. Componentes y bioquímica de degradación de alpeorujo seco y extractado.....	30
6.1.1. Lignina.....	30
Estructura.....	30
Bioquímica de degradación.....	30
6.1.2. Celulosa.....	32
Estructura.....	32
Bioquímica de degradación.....	33
6.1.3. Sustancias pécticas.....	34
Estructura.....	34
Bioquímica de degradación.....	34
6.1.4. Hemicelulosas.....	34
Estructura.....	34
Bioquímica de degradación.....	35
6.1.5. Lípidos.....	35
Estructura.....	35
Bioquímica de degradación.....	35
6.2. Microorganismos transformadores de alpeorujo seco y extractado.....	36
6.2.1. Bacterias.....	36
6.2.2. Hongos saprobios de la madera.....	37
1.1.1. Hongos saprobios del suelo.....	38

MATERIAL Y MÉTODOS

2. Características y composición del alpeorujo seco y extractado.....	41
---	----

2.1. Tratamiento de la muestra.....	41
2.2. Determinaciones analíticas del alpeorujo seco y extractado.....	41
pH.....	41
Carbono orgánico total.....	41
Carbono extraíble total.....	41
Ácidos húmicos y ácidos fúlvicos.....	42
Nitrógeno, Fósforo, Potasio y Sodio.....	42
Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Cadmio, Níquel, Cobalto y Plomo.....	42
Color.....	42
Componentes fibrosos.....	43
Fibra neutro detergente.....	43
Fibra ácido detergente.....	43
Lignina ácido detergente.....	43
Lignina polimérica precipitable en ácido.....	44
3. Características del suelo empleado.....	44
4. Plantas y condiciones de cultivo.....	45
4.1. Plantas.....	45
4.2. Esterilización de las semillas.....	45
4.3. Germinación y condiciones de crecimiento.....	45
5. Hongos saprobios.....	46
5.1. Aislamiento de hongos saprobios.....	46
5.2. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados.....	47
5.3. Medios y condiciones de cultivo de hongos saprobios.....	48
5.4. Proceso de incubación del alpeorujo con hongos saprobios.....	49
6. Hongos arbusculares.....	50
6.1. Tipos y características de los hongos arbusculares utilizados.....	50
6.2. Inoculación de micorrizas.....	50
7. Bacterias.....	50
7.1. Características de la cepa bacteriana utilizada.....	50
7.2. Obtención e inoculación de bacterias.....	51
8. Cuantificación de la micorrización de la raíz.....	51
8.1. Tinción con azul tripán (TB).....	51

8.2. Tinción vital de la succinato deshidrogenasa (SDH).....	52
9. Cuantificación de microorganismos en suelo.....	53
10. Identificación molecular de bacterias del suelo.....	53
10.1. Extracción de ADN bacteriano de suelo.....	54
10.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
10.3. Electroforesis de ADN bacteriano.....	55
10.4. Electroforesis de ADN bacteriano en gradiente de temperatura (TGGE)..	56
11. Análisis de la fitotoxicidad mediante germinación de semillas.....	57
12. Obtención y preparación de extractos enzimáticos de alpeorujó.....	58
13. Determinación de azúcares totales.....	60
14. Cuantificación de proteínas.....	60
15. Detección de actividades hidrolíticas de pared celular.....	61
15.1. Sustratos utilizados y preparación.....	61
15.2. Cuantificación de las actividades hidrolíticas.....	62
15.2.1. Actividades endohidrolíticas.....	62
15.2.2. Actividades exohidrolíticas.....	63
16. Estudio de otras actividades hidrolíticas.....	64
16.1. Lipasa y esterasa.....	64
16.2. Tanin-acilhidrolasa.....	65
17. Determinación de las actividades fenol oxidasas.....	65
17.1. Manganeseo peroxidasa.....	65
17.2. Lacasa.....	66
18. Determinación de las actividades enzimáticas involucradas en la descomposición de la materia orgánica.....	67
18.1. Fosfatasa.....	67
18.2. β -glucosidasa.....	67
19. Determinación de los compuestos fenólicos del alpeorujó seco y extractado.....	68
19.1. Contenido en polifenoles totales.....	68
19.2. Fraccionamiento del contenido fenólico.....	68
19.3. Extracción, análisis e identificación de los compuestos fenólicos del alpeorujó.....	69
19.3.1. Método 1.....	69
Proceso de extracción.....	69

Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección ultravioleta (CLAE-Uv).....	70
Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección por espectrometría de masas (CLAE-EM).....	71
19.3.2. Método 2.....	71
Proceso de extracción.....	71
Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia de intercambio iónico (RP-HPLC).....	72
Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular (SEC-HPLC).....	72
Determinación por espectrometría de masas acoplada a cromatógrafo de gases (GC-MS).....	73
I. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN Y FITOTOXICIDAD DEL ALPEORUJO SECO Y EXTRACTADO.....	74
1.1. Composición química del alpeorujó.....	74
Material y métodos.....	74
Resultados.....	74
1.2. Determinación de la fitotoxicidad del alpeorujó seco y extractado.....	75
1.2.1. Análisis de fitotoxicidad sobre germinación de semillas.....	75
Material y métodos.....	75
Resultados.....	76
1.2.2. Análisis de fitotoxicidad del alpeorujó sobre crecimiento de plantas.....	77
Material y métodos.....	77
Resultados.....	77
Discusión.....	80
II. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS PRODUCIDOS POR LOS HONGOS ARBUSCULARES EN LA PROTECCIÓN DE LA PLANTA FRENTE A LA ACCIÓN DEL ALPEORUJO.....	82
Material y métodos.....	82
Resultados.....	83
Discusión.....	93

III. TRANSFORMACIÓN DEL ALPEORUJO POR HONGOS SAPROBIOS.....	96
3.1. Estudio de la reducción de la fitotoxicidad del alpeorajo mediante el empleo de hongos saprobios productores de enzimas hidrolíticos.....	96
Material y métodos.....	96
Resultados.....	97
3.2. Estudio de la reducción de la fitotoxicidad del alpeorajo mediante el empleo de hongos saprobios productores de enzimas ligninolíticos.....	109
Material y métodos.....	109
Resultados.....	110
3.3. Cambios en la composición química del alpeorajo durante el proceso de transformación por hongos saprobios.....	112
Material y métodos.....	112
Resultados.....	113
3.3.1. pH.....	113
3.3.2. Color.....	114
3.3.3. Carbono extraíble total, ácidos húmicos y fúlvicos.....	117
3.3.4. Macro y micronutrientes.....	119
3.3.5. Lignina, hemicelulosa y celulosa.....	124
3.3.6. Azúcares totales.....	126
3.3.7. Contenido fenólico.....	127
3.4. Mecanismos de eliminación de la fitotoxicidad del alpeorajo por los hongos saprobios.....	141
Material y métodos.....	141
Resultados.....	142
3.4.1. Enzimas hidrolíticas.....	142
Actividades endohidrolíticas.....	142
Actividades exohidrolíticas.....	144
Actividades lipasa y esterasa.....	145
3.4.2. Enzimas ligninolíticas.....	146
Actividad manganeso peroxidasa.....	146
Actividad aril-alcohol oxidasa.....	147
Actividad lacasa.....	147
3.4.3. Actividades fosfatasa y β -glucosidasa.....	149

3.5. Efecto del uso del alpeorajo transformado por hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas inoculadas o no inoculadas con hongos arbusculares o <i>Rhizobium</i>	150
Material y métodos.....	150
Resultados.....	151
3.6. Evaluación del impacto del alpeorajo transformado sobre la microflora total del suelo.....	164
Material y métodos.....	164
Resultados.....	165
3.6.1. Actividades enzimáticas del suelo.....	165
3.6.2. Microorganismos del suelo.....	171
3.6.3. TGGE.....	177
Discusión.....	178
CONCLUSIONES.....	197
BIBLIOGRAFIA.....	198

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Agricultura industrializada

Existe un modelo de agricultura industrializada que se caracteriza por la utilización de agroquímicos y donde el término fertilización se entiende como el aporte desde el exterior de los elementos químicos de naturaleza mineral que intervienen en la constitución de los vegetales (Bellapart, 1988). Los agroquímicos pueden ser instrumentos excelentes cuando son correctamente aplicados, pero constituyen un grave peligro cuando son usados indebidamente. Las consecuencias que el uso creciente y excesivo de agroquímicos pueden tener sobre el medio y la salud de los seres vivos quedan reflejadas por su influencia en procesos como pérdidas de fertilidad y erosión del suelo, contaminación de los recursos naturales, degradación del medio ambiente así como problemas de salud. La aplicación de fertilizantes da lugar a un descenso de la materia orgánica en el suelo, por tanto hace bajar el nivel de la microbiota, cuya pérdida o disminución puede conducir a la mineralización y desertificación del suelo. Tiene lugar la pérdida de multitud de especies de microorganismos presentes en el suelo indispensables para conservar su fertilidad. Por lo tanto este concepto de fertilización no responde a la realidad del suelo como medio vivo ni a su dinámica. Básicamente, la fertilización como técnica debe estar enfocada a mantener o aumentar la fertilidad del suelo agrícola, entendiendo por fertilidad, la capacidad de los suelos agrícolas para mantener de manera perdurable un nivel de producción estable y de calidad, conservando un estado de alta estabilidad frente a los procesos que implican su degradación, y todo ello dentro de una amplia gama de condiciones locales agroambientales, socioeconómicas y culturales. El mantenimiento perdurable de la capacidad productiva requiere activamente de prácticas de conservación de suelos para mantener la integridad del perfil y evitar su degradación por deterioro de la estructura y por pérdida de las materias orgánicas y minerales más finas y activas como las arcillas (Gascó, 1998), y prácticas de fertilización orgánica que permitan el suministro equilibrado de nutrientes esenciales que potencian la biodiversidad edáfica y que optimicen los parámetros edáficos ligados igualmente a la conservación de los suelos de cultivo.

La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado vigencia a la temática de la inoculación. En efecto, la demanda impuesta por la sostenibilidad está conduciendo al uso de estrategias alternativas que mantenga una producción competitiva y la protección del medio ambiente. En este contexto, el uso de inóculos microbianos (*biofertilizantes*), incluyendo algunos que han

sido modificados genéticamente, esta cobrando un interés renovado. Microorganismos tales como *Rhizobium*, agentes de control biológico, hongos micorrizógenos etc, han sido objeto de investigaciones orientadas a su aplicación práctica.

Por otro lado, los fertilizantes a base de residuos (lodos de depuración, “composts” de basura y de residuos agroindustriales), que se están empleando de forma creciente en agricultura, pueden desempeñar también un papel clave en prácticas dirigidas a una agricultura sostenible.

2. Agricultura ecológica

Los términos agricultura ecológica, biológica, orgánica o biodinámica definen un sistema agrario cuyo objetivo fundamental es la obtención de alimentos de máxima calidad respetando el medio ambiente y conservando la fertilidad de la tierra, mediante la utilización óptima de los recursos y sin el empleo de productos químicos de síntesis (Consejo Regulador de la Agricultura Ecológica, 1990). La agricultura ecológica ofrece una solución lógica y con fundamento científico que radica en la alimentación activa del suelo a través del suministro de materia orgánica en sus distintas configuraciones, sin olvidar los aportes minerales en forma de rocas minerales pulverizadas (Shundt *et al.*, 1987).

El uso de materiales orgánicos como fertilizantes está ligado a la agricultura desde sus inicios, ya en el año 900 a. de C., Homero cita en la *Odisea* que el padre de Ulises añadía estiércol a sus viñas. En nuestros tiempos, las prácticas agrícolas tradicionales siguen estando vigentes, manteniendo la fertilidad de los suelos a través del riego, el uso de enmiendas orgánicas, con estiércol, restos de cosechas, etc.

La agricultura ecológica debe concebirse como parte integrante de un sistema de producción agraria sostenible y como una alternativa viable a un enfoque más tradicional de la agricultura. Desde la entrada en vigor de la legislación comunitaria sobre agricultura ecológica en 1992, se cuentan por decenas de miles los productores que han optado por este sistema de producción, como consecuencia del mayor conocimiento por parte de los consumidores de los productos derivados del cultivo ecológico, y de una demanda creciente de los mismos.

En los últimos años, estamos asistiendo a un desarrollo de la agricultura ecológica al que ha contribuido la creciente toma de conciencia por parte de los consumidores de las cuestiones relacionadas con la seguridad alimenticia y los problemas medioambientales. Aunque en el año 2.000 sólo representaba el 3% del total de la superficie agrícola útil de la UE, la agricultura ecológica se ha convertido de hecho en uno de los sectores agrarios más dinámicos dentro de la Unión Europea.

Dentro de los aportes orgánicos que aparecen en el Consejo Regulador de la Agricultura Ecológica, cabe destacar, el estiércol que es la mezcla de la cama de los animales y sus deyecciones, que ha sufrido fermentaciones más o menos avanzadas en el establo y después en el estercolero. Básicamente está formado por materiales hidrocarbonatos, compuestos nitrogenados y una gran población microbiana. Por otro lado, otro aporte orgánico importante es el estiércol de lombriz o lo denominado vermicompost.

Este producto es el resultado de la transformación de materiales orgánicos por una lombriz, *Eisenia foetida*, denominada “lombriz roja de California”. La transformación del material orgánico se produce al paso del mismo por su tubo digestivo y a su mezcla con compuestos minerales, microorganismos y fermentos, que provocan una transformación bioquímica inicial de la materia orgánica, siendo más rápida la humificación, la mineralización posterior en el suelo y la activación del metabolismo microbiano y vegetal.

Otra de las formas de aporte orgánico al suelo es mediante la adición de compost. La palabra compost proviene del latín *compositum* que quiere decir “reunión de diferentes materiales”, es el producto resultante del compostaje y puede ser aprovechado como abono orgánico o como sustrato. El compost es el producto de la fermentación aerobia de una mezcla de materiales orgánicos en condiciones específicas de humedad, aireación, temperatura y nutrientes. El compostaje ha sido utilizado desde hace siglos como medio para reutilizar los residuos orgánicos procedentes de la actividad agraria y de la doméstica. El compostaje puede definirse como un proceso biooxidativo y controlado en el que intervienen una gran diversidad de microorganismos, que requiere una humedad adecuada y sustratos orgánicos heterogéneos en su composición y homogéneos en cuanto a su tamaño y básicamente en estado sólido, dando al final como producto de los diferentes procesos de transformación dióxido de carbono, agua, minerales y materia orgánica estabilizada e higienizada, rica en poblaciones microbianas útiles, en sustancias húmicas y en bioactivadores de la fisiología vegetal.

Debido a que uno de los objetivos prioritarios de la agricultura ecológica es el mantenimiento de la fertilidad del suelo y que para ello se hace necesario la incorporación de materia orgánica, este sector se muestra como un gran demandante de esta materia. Por otra parte, una de las fuentes de materia orgánica clásicas, el estiércol, se encuentra en claro descenso, así se hace cada vez más patente que la cantidad de estiércol existente en un futuro cercano será insuficiente para cubrir la demanda.

En el caso concreto de olivar ecológico, se habla cada vez más de sostenibilidad, de forma que el olivar tiene que buscar por sí mismo fuentes de materia orgánica capaces de cubrir las necesidades de nutrientes del propio olivar. De este modo, se ha estudiado la riqueza de cada uno de los subproductos que produce el olivar, desde la hoja y la leña, hasta los propios alpechines, aunque actualmente las investigaciones se centran en el alpeorujo.

3. Importancia de microorganismos rizosféricos en agricultura

3.1. Conceptos generales

En 1904, Hiltner introdujo el término *rizosfera* para describir la zona del suelo afectada por el desarrollo de las raíces, donde proliferan gran número y diversidad de microorganismos. Las actividades metabólicas de tales poblaciones estimuladas, tanto desde el punto de vista cuali como cuantitativo, en la rizosfera son de vital importancia para el desarrollo de las plantas. El incremento de actividad microbiana en la rizosfera, ejercido por el suministro de compuestos orgánicos que aportan los exudados radicales y otros materiales, en general, residuos vegetales o microbianos, recibe el nombre de *efecto rizosférico*.

La composición de la comunidad microbiana en la rizósfera tendrá una importante consecuencia para el crecimiento de las plantas (Grayston y Campbell, 1996). De hecho, a pesar de su pequeño volumen en el suelo, los microorganismos juegan un papel clave en el ciclado de nitrógeno, azufre, y fósforo, y en la descomposición de residuos orgánicos. De este modo, afectan el ciclado de nutrientes y carbono en una escala global (Pankhurst *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista de sus relaciones con la planta los microorganismos del suelo, fundamentalmente bacterias y hongos, se dividen en tres grandes grupos: (a) saprofitos, que utilizan compuestos orgánicos procedentes de residuos animales, vegetales o microbianos; (b) simbioses parasíticas o "patógenos", causantes de enfermedades a las plantas; (c) simbioses mutualistas o simplemente "simbioses", como se les denomina en la literatura científica, los cuales benefician el desarrollo y nutrición vegetal. En resumen, las acciones que desarrollan los microorganismos beneficiosos en la rizosfera pueden concretarse en las siguientes:

- Estimulación de la germinación de las semillas y mejora del enraizamiento basada en la producción por los microorganismos (*fitoestimuladores*) de hormonas, vitaminas y otras sustancias.

- Incremento en el suministro/disponibilidad de nutrientes mediante la intervención de los microorganismos (*biofertilizantes*) en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes.

- Mejora de la estructura del suelo como consecuencia de la contribución microbiana en la formación de agregados estables (*mejoradores de agroecosistemas*).

- Incremento de la resistencia/tolerancia a salinidad, sequía, degradación de sistemas etc. (*mejoradores ecofisiológicos*).

- Desarrollo de fenómenos de antagonismo microbio-microbio (*biopesticidas, agentes de control biológico de patógenos*).

- Eliminación de productos o residuos xenobióticos (*biorremediadores*).

Dentro de los “microorganismos beneficiosos” se pueden destacar los hongos saprobios que desarrollan multitud de acciones en el ecosistema, desde la degradación de los detritus que dejan las plantas a la promoción del crecimiento y salud de estas.

Las bacterias rizosféricas saprofitas (PGPR) desempeñan funciones importantes para la planta como: control biológico de patógenos, solubilización (movilización) de fosfatos, fijación de N₂ o fitoestimulación, al facilitar la emergencia o el enraizamiento.

Sin embargo son los hongos micorrícicos y las bacterias fijadoras de N₂ los componentes más destacados entre los simbioses mutualistas.

3.2. Micorrizas

a) Generalidades

El término micorriza hace referencia a la asociación mutualista establecida entre determinados hongos del suelo y raíces de plantas superiores. Dicha asociación es de tipo mutualista ya que, normalmente, incrementa la eficiencia en la adquisición de elementos minerales, principalmente fósforo, por la planta hospedadora, la que a su vez, proporciona al hongo compuestos carbonados. El término micorriza fue utilizado por primera vez en 1885 por Bernhardt Frank para hacer referencia a unas estructuras especiales en las raíces de plantas. Sin embargo, muestras fosilizadas y datos moleculares señalan que el origen de la simbiosis micorriza arbuscular (MA) fue hace 450-500 millones de años (Remy *et al.*, 1994; Redecker *et al.*, 2000).

Los hongos micorrízico arbusculares están representados por más de 150 especies del Phylum Glomeromycota, hasta entonces Zigomycetes, englobadas en los

géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Scutellospora* y *Sclerocystis* (Morton y Benny, 1990; Schübler *et al.*, 2001; Schübler, 2002). Sin embargo, los datos obtenidos mediante análisis de secuencia de genes indican que es necesaria una reconsideración general de los conceptos genéricos dentro del orden Glomales con la reestructuración e inclusión de nuevas familias y géneros (Schübler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001).

Las micorrizas se encuentran prácticamente en todos los hábitats de la tierra, han sido descritas en desiertos (Titus *et al.*, 2002), bosques tropicales (Gaur y Adholeya, 2002), ambientes acuáticos (Khan, 1993), etc. El 90% de las plantas terrestres forman asociación con algún tipo de hongo micorrízico y son en su mayoría Angiospermas, algunas Gimnospermas, Pteridófitas y Briófitas (Smith y Read, 1997). Solo algunas familias botánicas entre ellas las Crucíferas, Ciperáceas y Quenopodiáceas, no forman micorrizas. Hoy en día se reconocen seis tipos de asociaciones micorrízicas, involucrando diferentes tipos de hongos y plantas hospedadores y distintos patrones morfológicos. Estas asociaciones se engloban en tres grupos fundamentales según que el hongo colonize o no a la planta intracelularmente: ectomicorrizas, ectendomicorrizas (arbutoides) y endomicorrizas (micorrizas arbusculares, ericoides y orguidoides). De todos estos tipos, las micorrizas arbusculares son el grupo más extendido en la naturaleza.

Aunque los hongos micorrízicos no muestran variaciones específicas en su habilidad para colonizar un amplio rango de plantas hospedadoras, varían considerablemente en sus poblaciones biológicas, en su especificidad ecológica y su actividad simbiótica (Giovannetti y Gianinazzi-Pearson, 1994). Hay muchos estudios acerca de las diferencias Inter. e intraespecíficas en la eficiencia de los hongos arbusculares en el crecimiento y la protección de las plantas (Harley y Smith, 1983; Sieverding, 1991; Ruiz-Lozano y Azcón, 1995; Ruiz-Lozano *et al.*, 1995).

Los hongos formadores de MA, son simbioses biotrofos obligados puesto que sólo pueden completar su ciclo de vida en presencia de la planta hospedadora. La imposibilidad del cultivo de los hongos arbusculares dificulta tanto la producción masiva, como la utilización de estos en agricultura extensiva (Jarstfer y Silvia, 1992).

b) *Formación de la simbiosis*

El hongo desarrolla un conjunto de hifas que colonizan el suelo a partir de la espora germinada (Sanders y Sheihn, 1983). Cuando una de estas hifas llega a la rizosfera de una planta susceptible, cambia su morfología, se ramifica abundantemente y forma un engrosamiento de la hifa en la superficie de la raíz que da

lugar a los puntos de entrada del hongo hacia el interior de la raíz denominado apresorio (Giovannetti y Citerinesi, 1993; Giovannetti *et al.*, 1994). La formación del apresorio está considerada como la señal que marca el paso del hongo de un estado saprobio al simbiótico (Giovannetti *et al.*, 1994; García-Garrido y Ocampo, 2002). La hifa de penetración avanza entre o a través de las células de la epidermis y se extiende hacia la corteza de la raíz. Las diferentes etapas en el proceso de infección necesitan la penetración de las paredes celulares vegetales por las hifas fúngicas. Las enzimas hidrolíticas parecen estar relacionadas con la penetración y el desarrollo de los hongos arbusculares en raíces de plantas de hecho se han encontrado actividades celulasa, pectinasa y xiloglucanasa en raíces colonizadas y en el micelio externo de hongos MA (García-Romera *et al.*, 1991a; García-Garrido *et al.*, 1992b; Rejón-Palomares *et al.*, 1996b). Se han observado diferencias en las actividades celulasa y pectinasa entre algunos isotipos de *Glomus* (García-Garrido, 1991; García-Romera *et al.*, 1991b). Por lo tanto es posible que variaciones en la capacidad de colonización de tejidos del hospedador pueden estar relacionados con la capacidad de los hongos para producir enzimas hidrolíticos (Gianinazzi-Pearson, 1994).

Una vez que han penetrado las hifas, siguen su desarrollo longitudinalmente por los espacios intercelulares y en las zonas más internas del parénquima cortical se ramifican lateralmente, penetran en las células y se dividen de forma dicotómica repetida, formando una estructura en forma de árbol característica de este tipo de simbiosis y responsable del intercambio de nutrientes, llamada arbusculo; incluso algunos hongos MA desarrollan vesículas ricas en lípidos dentro de la raíz, que actúan posiblemente como órganos de reserva del hongo (Smith y Read, 1997). Los arbusculos son de gran importancia para el funcionamiento de la simbiosis y es donde se presupone que tiene lugar el flujo bidireccional de nutrientes (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1990).

c) *Fisiología de las micorrizas*

El efecto de las micorrizas más ampliamente descrito es la promoción del crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas. Las plantas en asociación con hongos arbusculares poseen mayor capacidad para la nutrición mineral, efecto que repercute directamente en un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas. El transporte bidireccional de nutrientes que tienen lugar en el arbusculo provee al hongo de productos de la fotosíntesis, esenciales para su desarrollo ya que es heterótrofo, y compensa a la planta con la captación de agua y nutrientes del suelo, principalmente el fósforo, que

son transportados a través del micelio externo. Ello significa que el hongo no es necesariamente dependiente de la planta en cuanto a nutrientes inorgánicos (Gianinazzi-Pearson y Smith, 1993).

Los estudios fisiológicos que se han llevado a cabo en micorrizas arbusculares han puesto de manifiesto su actuación preferente sobre la captación y aporte de P a la planta (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991; Jakobsen, 1995). Los niveles de P en las plantas micorrizadas son, en general, muy superiores a los de las no micorrizadas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988), lo que se explica por un mayor flujo de P hacia la planta gracias al aumento de la superficie de captación, como consecuencia de la formación de micelio externo del hongo (Cooper, 1984; Jakobsen, 1995).

Además de proporcionar a las plantas fósforo y otros nutrientes, se han descrito otros efectos beneficiosos de los hongos MA, como una mayor capacidad de resistencia a estreses tanto de tipo abiótico; como la sequía (Augé, 2001) o altos niveles de metales pesados o biótico como la enfermedad causada por agentes patógenos (Bodker *et al.*, 1998; Vaast *et al.*, 1998; Slezack *et al.*, 2000; Essen *et al.*, 2001). Hay que sumar a todo ello, un importante factor ecológico y edáfico, pues la raíz en asociación micorriza-arbuscular constituye un elemento primordial en el mantenimiento y mejora de la fertilidad del suelo. Por tanto, la simbiosis MA puede indicarse como un componente importante de la agricultura sostenible (Bethlenfalvay y Lindermann, 1992; Jeffries y Barea, 2001).

d) *Ecología de las micorrizas*

Hay diversos estudios sobre la utilización de micorrizas en biorremediación de suelos contaminados con metales que ponen de manifiesto la resistencia de hongos MA y bacterias rizosféricas a los metales pesados así como su capacidad para incrementar la tolerancia a estos (Vivas *et al.*, 2003a, b). Los hongos MA estimulan la repoblación de vegetación de suelos en zonas mineras (Schramm, 1966) mediante el aumento en la capacidad de absorción de nutrientes del sistema radical de la planta (Hayman, 1983), incrementando su supervivencia y crecimiento (Perry y Amaranthus, 1990). Hay bastantes evidencias de que la colonización arbuscular puede reducir la acumulación de metales en plantas cultivadas en suelos contaminados (Arines *et al.*, 1989; Bethlenfalvay y Frason, 1989; Vivas *et al.*, 2003b; Vivas *et al.*, 2005).

Se ha puesto de manifiesto que los hongos micorrícicos confieren tolerancia a la planta frente a la aplicación de sustancias fitotóxicas tales como pesticidas (Ocampo, 1993) y residuos petrolíferos (Cabello, 1997). Las micorrizas pueden aliviar estreses causados por algunos herbicidas (Ocampo y Barea, 1985; García-Romera y Ocampo,

1988; García-Romera *et al.*, 1988; Dod y Jeffries, 1989). Aunque normalmente los herbicidas tienen poco o ningún efecto en MA, sin embargo, se han descrito algunos que las inhiben (Smith *et al.*, 1981; Spokes *et al.*, 1981; Tommerup y Briggs, 1981).

Se sabe que diversos compuestos fenólicos, muy comunes en residuos tóxicos, tienen efectos negativos en el establecimiento de la simbiosis MA, y en el crecimiento de las plantas hospedadoras (Leadir *et al.*, 1997). También se han descrito evidencias de que los flavonoides reducen los efectos negativos de algún herbicida sobre el crecimiento de plantas y la colonización por hongos micorrícicos arbusculares (Siquiera *et al.*, 1991). Sin embargo, el papel de los compuestos fenólicos en la simbiosis arbuscular no está claro ya que fenoles aplicados exógenamente pueden estimular la población indígena de los hongos MA, dando lugar a un aumento en el crecimiento de las plantas y la producción (Siqueira *et al.*, 1992).

Dependiendo de la concentración, diferentes flavonoides pueden incrementar o disminuir la germinación de esporas de hongos MA y el crecimiento y la ramificación de las hifas (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Fair *et al.*, 1991; Tsai y Phillips, 1991; Becard *et al.*, 1992; Baptista y Siquiera, 1994). Se ha demostrado que las isoflavonas, formononetina y biocanina A y en menor medida la flacona crisina administrada a la simbiosis formada por *Glomus-Trifolium* pueden estimular la colonización de raíz y el crecimiento de la planta (Siquiera *et al.*, 1991b, c). Otros autores proponen que estos compuestos, sin embargo, provocan solo incremento de la germinación, crecimiento de las hifas o producción de células auxiliares y no afectan sin embargo el crecimiento continuo y la producción de nuevas esporas por lo que postuló que pueden no ser necesarios para el establecimiento de la simbiosis (Bécard *et al.*, 1995). El ácido ferúlico y aleloquímicos encontrados en raíces de espárragos, disminuyeron la colonización de raíz por hongos AM y redujeron el crecimiento de las micorrizas de los espárragos (Wacker *et al.*, 1990a).

No se sabe cuales son los mecanismos por los que las micorrizas confieren mayor tolerancia a las plantas frente a los elementos tóxicos. De forma generalizada la mayor tolerancia se atribuía a la mejor nutrición de las plantas micorrizadas como consecuencia de la mayor capacidad de captación de fósforo, sin embargo se han ido encontrando evidencias cada vez mayores de que hay mecanismos específicos propios de los hongos arbusculares o inducidos en la planta implicados en la mayor tolerancia de las mismas a elementos tóxicos ambientales (Ocampo, 1993). Se sabe que los hongos arbusculares producen e inducen en la planta celulasas, pectinasas y hemicelulasas (García-Romera *et al.*, 1991; García-Garrido *et al.*, 1992,1999) y que algunos de estos enzimas hidrolíticos degradan sustancias tóxicas presentes en el alpeorujo (Aranda *et al.*, 2003).

e) *Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos rizosféricos*

Los hongos micorrícicos arbusculares (MA) se conocen por influenciar y ser influenciados por las actividades de los microorganismos del suelo (Bagyaraj 1990; Andrade *et al.*, 1997). La micorriza puede afectar a la población microbiana directamente o indirectamente en la rizosfera por cambios en los exudados de raíz o por exudados de los hongos (Linderman, 1992). Inversamente, numerosos microorganismos del suelo interactúan con los hongos micorrícicos mediante la producción de sustancias que estimulan el crecimiento de plantas o inhibiendo los patógenos de la raíz (Jeffries y Dodd, 1996). Los microorganismos del suelo principalmente influyen los hongos micorrícicos cuando estos hongos están en la fase extramatricial (Caron *et al.*, 1985; McAllister *et al.*, 1994). Exudados volátiles y solubles producidos por los microorganismos del suelo están relacionados con dichos efectos (McAllister *et al.*, 1994; Fortín *et al.*, 2002).

f) *Micorrizas y residuos agroindustriales*

Se han realizado experimentos en los que se relaciona la inoculación con micorrizas y la adición de residuos agroindustriales. Así, hay estudios que muestran el efecto positivo de la inoculación de micorrizas en el desarrollo de la planta leguminosa *Dorycnium pentaphyllum* L. crecida con residuos de la caña de azúcar, fosfato de roca y el hongo *Aspergillus niger* (Caravaca *et al.*, 2004).

3.3. *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* se caracterizan por su capacidad de establecer simbiosis mutualista fijadora de nitrógeno con plantas leguminosas suministrando a la planta una fuente de nitrógeno exclusiva, el dinitrógeno atmosférico, fijado de forma estable e incorporando a la planta como aminoácidos o proteínas.

La simbiosis mutualista de *Rhizobium* con plantas leguminosas está marcada por la producción en las raíces de las leguminosas de nódulos, considerados como verdaderos órganos fijadores de nitrógeno, ya que ahí es donde tiene lugar la fijación simbiótica de nitrógeno. Antes de su colonización por *Rhizobium*, los pelos radicales de la raíz de la planta huésped se ramifican y elongan. Por otro lado, las moléculas de tipo flavonoide exudadas por la planta inducen la expresión de los genes de

nodulación (nod) y la subsiguiente síntesis de señales o factores nod que son compuestos de tipo lipoquito-oligosacáridos los cuales inducen en la raíz la formación de meristemas cuyo crecimiento organizado dará lugar al nódulo (Mylona *et al.*, 1995). Estos exudados radicales promueven además en *Rhizobium* la producción de polisacáridos de naturaleza diversa que se acumulan en la superficie de la bacteria. La adhesión de la bacteria a la raíz parece estar mediada por alguno de estos compuestos superficiales (Dazzo y Truchet, 1983; Díaz *et al.*, 1989). A través de los canales de infección, las bacterias acceden hacia el interior del nódulo, donde se quedan rodeadas por células vegetales, en cuyo interior las bacterias pierden la movilidad y se diferencian en bacteroides. En los bacteroides es donde se utilizan los compuestos fotosintetizados por la planta como fuente de energía para llevar a cabo la reducción del dinitrógeno atmosférico a amonio utilizado por la planta para su metabolismo (Whitehead y Day, 1997).

Las interacciones con grupos de microorganismos del suelo (por ejemplo hongos micorrícicos arbusculares) de las bacterias del género *Rhizobium* para el establecimiento de la simbiosis son particularmente relevantes. La presencia de N₂ combinado en el suelo es un factor ambiental importante que interfiere con la nodulación y colonización MA. La colonización micorrícica afecta al desarrollo y función de los sistemas fijadores de N₂ y la simbiosis micorriza también afecta al intercambio de N₂ y al metabolismo de plantas colonizadas (Johansen *et al.*, 1994; Azcón y Tobar, 1998; Hawkins y George, 1999). El efecto de la simbiosis MA en la nutrición y metabolismo de N₂ puede determinar la respuesta de plantas leguminosas noduladas a la fertilización con N₂. Sin embargo, la concentración de N₂ en el suelo, puede ser el principal determinante de los efectos micorrícicos, nodulación y colonización MA son procesos interactivos en las raíces de legumbres.

El uso combinado de varios microorganismos incluyendo bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos MA, puede presentarse como una interesante alternativa en ambientes degradados ya que provocan en las plantas beneficios cruciales para su desarrollo, lo que generaría la restauración de su propio hábitat (Jeffries *et al.*, 2002). Se han realizado también estudios del uso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa para la biorremediación de suelos contaminados. Uno de los estudios realizados corresponde a la biorremediación de suelos contaminados con metales procedentes de las actividades mineras en Aznalcollar, Sevilla. Los resultados obtenidos mostraron la resistencia de la mayoría de las especies de *Rhizobium* a la contaminación con metales pesados así como la efectividad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa para remediar las áreas afectadas (Carrasco *et al.*, 2005).

4. Actividades enzimáticas como índice de actividad biológica del suelo

La medida de la biomasa microbiana, así como de las actividades enzimáticas del suelo son una herramienta ampliamente empleada en la valoración de la actividad biológica del suelo. La actividad enzimática del suelo es un punto clave de los ciclos de los nutrientes, por ello la medida de las actividades enzimáticas específicas junto con el uso de parámetros generales del suelo pueden ser de gran ayuda para evaluar el estado de actividad biológica del suelo y conocer la respuesta del mismo a las distintas prácticas de cultivo (Nannipieri *et al.*, 1990).

El estudio de las enzimas del suelo, en particular oxidoreductasas e hidrogenasas ha experimentado un claro auge en los últimos años debido fundamentalmente al papel que desempeñan las enzimas en la evolución y procesos degradativos de la materia orgánica. Las enzimas desempeñan un papel fundamental en los ciclos de elementos importantes como el nitrógeno (ureasa y proteasas), el fósforo (fosfatasas) o el carbono (β -glucosidasas), de ahí, la importancia del estudio de este tipo de enzimas cuando se realizan enmiendas orgánicas en los suelos: por una parte, el material orgánico puede incorporar directamente enzimas; y por otra, la materia orgánica adicionada potenciará la actividad microbiana y en definitiva aumentará la actividad enzimática (Martens *et al.*, 1992; Goya *et al.*, 1993).

Las actividades enzimáticas pueden mejorar nuestro conocimiento sobre efecto de pesticidas, enmienda orgánica, y otros compuestos sobre la calidad de los suelos (García *et al.*, 1992; Gil-Sotres *et al.*, 1992).

4.1. Actividad β -glucosidasa

La enzima β -glucosidasa está involucrada en el desarrollo del ciclo de carbono en suelos, puesto que se encarga de catalizar reacciones de hidrólisis de cadenas no reducibles de β -D-glucosidos para formar β -glucosa. Esta enzima, podrá reflejar el estado de la materia orgánica en el suelo y todos los procesos que tengan lugar en ella, desde la mineralización hasta la humificación (García *et al.*, 1992). Su distribución en la naturaleza es bastante amplia estando presente tanto en plantas como en microorganismos, e interviniendo en la descomposición de residuos tanto de plantas como en microorganismos (Hayano y Tubaki, 1985).

Esta enzima es bastante sensible a la presencia de metales pesados y otros contaminantes que pueden acompañar a los residuos orgánicos (Eivazi y Zakari, 1993). Por tanto, la determinación de la actividad β -glucosidasa no es sólo importante

para hacer referencia cualitativa del estado de descomposición en que se encuentra la materia orgánica, sino que es capaz de ser un biomarcador del estado de contaminación del suelo.

4.2. Actividad fosfatasa

La asimilabilidad del fósforo para las plantas depende en gran parte de la mineralización que experimenten las diferentes fracciones de dicho fósforo unidas a las formas orgánicas. Las enzimas fosfatasas tienen un papel importante en las reacciones que tengan lugar en dicho proceso, ya que son las encargadas de hidrolizar fósforo en forma orgánica hasta formas inorgánicas, haciéndolo por tanto asimilable a las plantas.

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre el tema atribuyen un origen microbiano a la fosfatasa en el suelo, aunque en muchas ocasiones su actividad es temporal y se pierde con rapidez (Dick y Tabatabai, 1993). La presencia de vegetación puede incrementar dicha actividad debido a una estimulación de la actividad microbiana y por la propia secreción de la enzima a través de las raíces.

Las fosfatasas son inhibidas tanto por el producto final de su reacción enzimática, fósforo inorgánico, ya que presenta una retroinhibición, como en presencia de iones metálicos en el suelo (Juma y Tabatabai, 1978; Nannipieri *et al.*, 1979; Red *et al.*, 1987).

4.3. Otros índices: contabilización microbiológica, pruebas moleculares

A pesar de que los métodos tradicionales microbiológicos y bioquímicos son un buen índice de la actividad biológica de los suelos a veces es difícil establecer diferencias en cuanto a aumento o disminución de microorganismos tras la incorporación de enmiendas a un suelo. El desarrollo moderno de la Ecología Microbiana en los sistemas Suelo-Planta se está enriqueciendo merced a los avances en el campo de la Biología Molecular que están permitiendo mejorar los conocimientos en aspectos tales como la aproximación estructural de la comunidad microbiana del suelo.

5. El olivo

5.1. Historia del olivo

El legendario árbol del olivo y el aceite obtenido de sus frutos han acompañado la historia de la humanidad. Desde el principio, el olivo y sus frutos han estado presentes en la historia de los hombres; ya sea en sagrados rituales o en la vida cotidiana, el aceite de oliva fue utilizado no sólo para enriquecer los alimentos sino también en diversas técnicas de masaje y en cosmética.

El origen del cultivo del olivo es incierto. Ciertos historiadores indican que el olivo procede de Persia, otros del valle del Nilo y otros indican que es originario del valle del Jordán. Sin embargo la mayoría creen que procede de la antigua Mesopotamia, lugar desde el cual se expandió al resto de los países. Su cultivo para la obtención de aceite de oliva empieza en las épocas paleolítica y neolítica (5000 a 3500 A.C.), aunque los primeros documentos escritos sobre el aceite lo constituyen las tablillas minoicas, que constituyen el mayor testimonio arqueológico de la importancia del aceite de oliva en la corte del rey Minos para la economía cretense 2500 años A.C.

El primer cultivo del aceite se desarrolla, por lo tanto, en una región incluida entre Palestina, Creta y Egipto. El aceite de oliva se convierte en una sustancia de capital importancia en la Grecia Antigua y la producción aceitera griega, junto a la fenicia, invade el Mediterráneo. Los griegos son los encargados de introducir el cultivo del olivo en Italia, donde se adaptó fácilmente. Así, desde el siglo VI A.C., se propaga por toda la cuenca del Mediterráneo, pasando por Trípoli y Túnez, a la isla de Sicilia y, desde allí, a la Italia meridional. En la Península Ibérica, se ha fechado la presencia del olivo desde tiempos prehistóricos, ya que se han encontrado huesos de aceituna en yacimientos neolíticos en El Garcel. Durante la dominación romana, Hispania ya tenía un considerable número de olivos dando fruto. Después de la tercera guerra púnica, el olivar ocupa una importante extensión en la Bética y se expandía hacia el centro y el litoral mediterráneo de la Península Ibérica.

El cultivo en España se vió notoriamente incrementado, especialmente en el Valle del Guadalquivir, durante los ocho siglos de civilización hispano-árabe. Los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España e influyeron en su difusión del cultivo hasta el punto de que los vocablos castellanos de aceituna, aceite o acebuche, tienen raíz árabe; por ejemplo, la palabra española "aceite" proviene del árabe "al-zait" que significa "jugo de aceituna". Con el Descubrimiento de América (1492), España

llevó el olivo a América. De Sevilla parten los primeros olivos hacia las Antillas y después al continente. Se introdujo principalmente a lo largo de los siglos XVI y XVII en Perú, Chile, Argentina y México. En la actualidad puede encontrarse en California y en distintas partes de Sudamérica. Hoy el olivo se ha extendido más allá de las zonas mediterráneas, hasta difundirse por todos los continentes exceptuando la Antártida. Hay olivares en África del Sur, en China y Vietnam, en Oceanía Meridional, en toda América, y la producción total de aceite de oliva del Globo está en un constante crecimiento desde principios del siglo XX.

En la actualidad, el país que más olivos posee es España (más 300 millones de olivos), seguido a gran distancia por Grecia e Italia y un poco más atrás se encuentran situadas Túnez, Turquía, y Siria. En España, la propiedad de los olivares está bastante dispersa, es decir, hay gran cantidad de personas con explotaciones de tamaño pequeño o mediano, a menudo situadas en zonas de baja productividad, de tal forma que en la mayoría de los casos los rendimientos obtenidos con la venta de aceituna no son más que una pequeña ayuda para los propietarios, que buscan mantener las explotaciones a menudo heredada de antepasados.

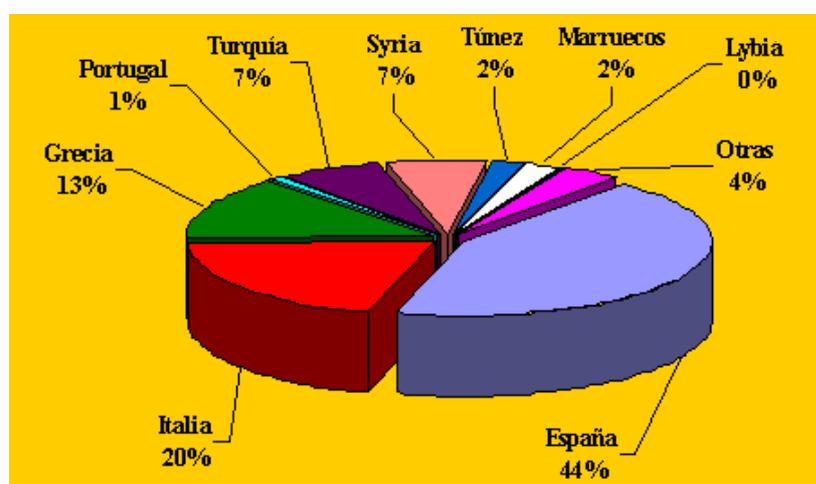
5.2. La olivicultura española

El olivar ha representado el sistema agrario productor de aceite por excelencia en la cuenca mediterránea. Junto a las rotaciones de cereales y leguminosas, y al viñedo, ha constituido la base de la agricultura de secano de los países ribereños desde hace más de dos mil años. Se trata, en general, de un sistema de producción basado en la excelente adaptación de la planta a las condiciones de sequía de su área de cultivo. Varios son los trazos que configuran la historia del olivar español: el aumento de la superficie plantada que ha conducido progresivamente a la roturación de suelos marginales; el carácter eminentemente comercial de su cultivo y la disponibilidad de mano de obra abundante y barata.

En cuanto al material vegetal utilizado, tal y como refiere Barranco (1994), se presentan una serie de características definitorias: antigüedad, diversidad y localización específica del material vegetal, y ausencia generalizada de patrones. Puede decirse, que en España, se cultivan las mismas variedades que hace cientos de años aunque se vienen desarrollando trabajos al respecto desde los últimos 50 años: selección clonal en distintas variedades (Berenguer-García 1978; Abela y Fernández Serrano, 1983), aspectos metodológicos en la selección y mejora del material vegetal (Humanes *et al.*, 1967; Rallo y Nahlawi, 1976), inducción de mutaciones (Moretini, 1954), etc.

5.3. Producción de aceite de oliva

La producción de aceite de oliva ha estado siempre concentrada en los países del perímetro mediterráneo: España, Portugal, Italia, Grecia, Turquía, Túnez y Marruecos. Solamente estos siete países representan el 90% de la producción mundial. La tendencia de la producción por países es globalmente al alza, aunque en términos de fluctuación, con la evidente constatación de la gran influencia que ejercen los dos principales países productores.



Fuente: Secretariado de la UNCTAD según los datos de FAO

Fig. 1. Principales países productores de aceite de oliva en 2003.

España es el primer país productor mundial de aceite de oliva, con una producción media anual de 700.000-800.000 toneladas, llegando a alcanzar 1.400.000 en recientes campañas. Con más de 300 millones de olivos cubriendo más de 2 millones de hectáreas, su superficie cultivada representa más del 25% de la superficie olivarera mundial. En España se cuentan más de 260 variedades de olivo que da lugar tanto a aceites mono-varietales como a mezclas que permiten asociar las cualidades y sabores complementarios de distintas variedades. La producción de aceite de oliva en España se distribuye a nivel regional de la siguiente forma: Andalucía (80%), Castilla la Mancha (7%), Extremadura (5%), Cataluña (3,5%), resto de España (4,5%).

Los principales países consumidores son igualmente los principales países productores. Los países de la Unión Europea representan el 71% del consumo mundial, mientras que los países de la cuenca mediterránea suponen el 77% del consumo mundial. El resto de países consumidores son Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón.

Los países productores más importantes son también los principales países exportadores, así los países de la cuenca mediterránea son los que concentran más del 95% de las exportaciones de aceite de oliva. España es el primer país exportador mundial, con una media anual en los últimos 10 años de unas 300.000 toneladas exportadas, alcanzando las 600.000 toneladas en algunas campañas. El aceite de oliva español es exportado a más de 100 países en los 5 continentes.

5.4. Procesos de obtención del aceite de oliva

El aceite de oliva se extrae de la aceituna, fruto del olivo (*Olea europea*). La composición del fruto es muy variable, en función de la variedad de la aceituna, del suelo, del clima y del cultivo, pero por término medio está compuesta de: aceite (18-28%), agua de vegetación (alpechín) (40-50%), hueso y tejidos vegetales (orujo) (30-35%).

Un buen aceite de oliva se obtiene de la aceituna sana, madura y entera, conforme se reciben debe ser procesada, sin esperar, porque los procesos fermentativos comienzan pronto y deterioran la calidad suministrando al aceite mal olor, sabor o elevando la acidez.

El aceite de oliva virgen se obtiene, a partir del tratamiento de las aceitunas en las almazaras, a través de procedimientos mecánicos o medios físicos en condiciones especialmente térmicas, que no producen alteración del aceite; este aceite de oliva virgen es apto para el consumo, pero también se generan aceites no aptos para dicho consumo, a los que se denomina aceites de oliva vírgenes lampantes. Estos últimos serán sometidos a un proceso de refinado y una posterior mezcla con aceite de oliva virgen, obteniéndose el aceite de oliva, que es el más consumido.

Las operaciones fundamentales del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen extra son las siguientes:

5.4.1. Recepción y selección

La almazara recibe las aceitunas y lo primero que tiene que hacer es comprobar que las aceitunas defectuosas (enfermas, suelo, rotas, etc) vengán separadas de las aceitunas sanas y recogidas directamente del árbol, para proceder a su control de entrada por líneas diferentes.

5.4.2. Limpieza, lavado y pesada

Tras la recepción y selección se procede a la eliminación de las hojas y el lavado. Estas operaciones, que realizan por este orden, máquinas automáticas provistas de un sistema de aspiración de las hojas y de una pila con circulación forzada de agua para el lavado de las aceitunas, tienen por finalidad limpiar los frutos de impurezas de origen vegetal, como hojas y ramillas, y mineral, como polvo, tierra, piedras y otros cuerpos sólidos, además de posibles restos de contaminantes agrícolas, como los pesticidas, que pueden representar entre el 5 y 10% del peso del fruto en el momento de entrar en la almazara. Durante esta operación se generan dos subproductos, hojas de olivo u hojín y aguas de lavado de aceitunas.

5.4.3. Molienda

Esta operación tiene por objeto romper las células de la pulpa y provocar la salida del aceite de las vacuolas para su reunión en gotas más gruesas y permitir su separación. Hasta 1960, la tecnología oleícola había utilizado únicamente el molino de rulos pero hoy día se utilizan los trituradores metálicos o molinos de martillos.

5.4.4. Batido

La operación de batido de la pasta de aceitunas consiste en un removido lento y continuo de la misma que se efectúa en recipientes de acero inoxidable (batidoras) de forma semicilíndrica o semiesférica, provistos de un sistema de calentamiento apropiado. Esta operación tiene por finalidad romper la emulsión aceite/agua y facilitar la reunión de las minúsculas gotas de aceite en gotas de diámetro superior que permite la separación del aceite en fase continua. Las gotas de pequeño tamaño permanecen en estado de emulsión y son arrastradas en los subproductos, sobre todo en el alpechín.

Como muestran los resultados de muchas investigaciones específicas, el aumento de temperatura y de la duración del batido da como resultado el incremento del rendimiento en aceite en la extracción, cualquiera que sea el sistema empleado. Sin embargo, el incremento de temperatura (superior a 30-35°C) y de la duración del batido tiene una incidencia negativa sobre el contenido en antioxidantes naturales y vitaminas de los aceites.

5.4.5. Extracción

Es la etapa fundamental para la extracción del aceite y se basa en la separación de los líquidos contenidos en la pasta de aceituna. Actualmente se realiza por dos

métodos fundamentalmente: presión (sistema tradicional) y centrifugación (sistema continuo).

a) Extracción por presión

Históricamente la extracción por presión es el procedimiento más antiguo y utilizado para obtener el aceite de oliva. Hasta hace pocos años, todas las almazaras utilizaban este sistema de extracción por presión, que separa la parte líquida de la pasta (mezcla del aceite con el alpechín de las aceitunas), del orujo o parte sólida, mediante un proceso de filtrado favorecido por la presión.

Este sistema permite obtener aceites excelentes, gracias a las bajas temperaturas a lo largo del proceso. Sin embargo los principales inconvenientes para la aplicación práctica de este sistema son los elevados costes de mano de obra, la discontinuidad del proceso y los gastos inherentes al empleo de materiales filtrantes en condiciones óptimas.

b) Extracción por centrifugación

La innovación y la investigación tecnológica en el sector han provocado un notable paso adelante, registrándose una significativa transformación (Di Giovacchino, 1991); se han introducido sistemas más potentes y de ciclo continuo, permitiendo un sustancial crecimiento de la capacidad productiva. En el sistema continuo, la extracción del aceite se realiza por acción de la fuerza centrífuga sobre la pasta de oliva recurriendo a máquinas rotativas horizontales de elevada velocidad (decanter).

Dentro de la extracción por centrifugación se pueden distinguir dos métodos:

Sistema continuo de tres fases

En el sistema de tres fases, la pasta con agua caliente, se introduce en una centrífuga horizontal o decánter y se produce una separación de fases o compuestos que poseen distintas densidades; así se produce una fase líquida oleosa o aceite, otra fase líquida acuosa o alpechín resultante del agua añadida y la propia que contiene el fruto y una fase sólida u orujo compuesta por los desechos de la aceituna.

La conveniencia de utilizar sistemas de ciclo continuo frente al de extracción por presión deriva de la mayor productividad horaria y de la disminución del coste por tonelada de aceituna (alrededor del 40-50%) (Almirante y Renzo en Leone, 1993; Leone, 1993). Con la implantación de los sistemas de centrifugación de tres fases, el

número de almazaras ha disminuido notablemente, pasando de las 7.000 en los años sesenta a las 1.900 actuales (Uceda, 1994).

Sin embargo, esta separación descrita no es totalmente perfecta ya que se eluyen componentes mezclados en todas las fases, por lo que hay que proceder a un proceso de separación posterior tanto en las fases líquidas (aceite y alpechín) como en la fase sólida (orujo). Esta operación se lleva a cabo con unas centrifugas verticales y que giran a mayor velocidad que el decánter. Otra desventaja del sistema continuo de 3 fases es que requiere la adición suplementaria de agua para fluidificar la pasta durante el batido. Es decir, se incrementa notablemente el volumen de efluentes producidos, oscilando entre 1,0-1,2 l por kg de aceituna transformada que suponen serios problemas medioambientales en las regiones de producción de olivar (Alba *et al.*, 1993; Tomati *et al.* 1995). La adición de agua caliente provoca además la eliminación de determinadas sustancias contenidas en los alpechines, entre las que se encuentran especialmente los antioxidantes naturales presentes en los aceites. El reciclado de los alpechines, en sustitución del agua del grifo, elimina este inconveniente y además, reduce el consumo de agua y el volumen de aguas residuales que hay que evacuar.

Sistema continuo de dos fases

En la campaña 1991-92 se introdujo en España el nuevo sistema ecológico de dos fases que permite la separación del aceite sin la adición de agua y por tanto con una producción muy reducida de agua de vegetación con bajo poder contaminante (Alba *et al.*, 1992; Alba *et al.*, 1993). Este sistema es idéntico en el procedimiento al de tres fases, la variación consiste en la sustitución de la centrifuga horizontal o decánter por otro que no precisa de tanta adición de agua, produciendo solamente dos fases, una líquida (aceite), y otra que la forman la salida conjunta del orujo y del alpechín, obteniéndose un subproducto más húmedo que el orujo del sistema de tres fases, denominado alpeorujo, cuyo tratamiento es más complicado para las extractoras, necesitando unos secaderos especiales.

La calidad del aceite proveniente del sistema de dos fases es superior, presentando un contenido en polifenoles mayor que el aceite del sistema de tres fases (Alba *et al.*, 1992; Uceda *et al.*, 1995). Esto implica que el aceite extraído con el nuevo sistema tiene una mayor capacidad antioxidante debido a que estas sustancias fenólicas protegen al aceite del ataque del oxígeno del aire, impidiendo así el enranciamiento en el tiempo. Los polifenoles reducen además del estrés oxidativo biológico, teniendo así, a nivel terapéutico, un importante papel en la prevención de las

enfermedades cardiovasculares y del cáncer como ha sido reconocido por la comunidad médica mundial (Keys, 1970; Esterbauer, 1988; Mataix, 1994). Las sustancias fenólicas tienen también una influencia notable sobre las características organolépticas (Solinas, 1990), de hecho el aceite del sistema de dos fases posee las notas de frutado, amargo y picante notablemente acentuadas respecto al sistema de tres fases (Uceda *et al.*, 1995).

No obstante, aún con la desventaja en el uso y manejo del orujo, el sistema de dos fases se ha difundido notablemente por toda la geografía española en las últimas campañas sobre todo debido a la ausencia o escasa producción de alpechín. Actualmente más de 70% del aceite de oliva español se extrae con el sistema de dos fases. También cabe destacar que ha sido considerable el aumento de la capacidad de elaboración tanto teórica como real; de 26.000 t/8 h se ha pasado a 50.000 t/8 h (Uceda, 1994), lo que ha permitido reducir el tiempo de almacenamiento de los frutos en las almazaras. Con ello se ha conseguido reducir notablemente los problemas de atrojado, que era el principal motivo de alteración de la calidad del aceite.

La Tabla 1 expone datos de los principales subproductos generados mediante las extracciones de tres y dos fases (Almirante *et al.*, 1993).

Tabla 1. Datos obtenidos de orujo y alpechín en las extracciones de tres y dos fases.

	Extracción en tres fases	Extracción en dos fases
Capacidad de extracción de aceite	85%a	86%a
ORUJO		
Cantidad (kg/100 kg de olivas)	50.7a	72.5b
Humedad (%)	52.7a	57.5b
Aceite (%)	3.18a	3.16a
Aceite (% materia seca)	6.68a	7.44a
Aceite (kg/100 kg de olivas)	1.60a	2.28b
Orujo seco (kg/100 kg de olivas)	23.9a	30.7b
ALPECHÍN		
Cantidad (litros/100 kg de olivas)	97.2b	8.30a
Aceite (g/litro)	12.6a	13.4a
Aceite (kg/100 kg de olivas)	1.20b	0.14a
Residuo seco (kg/100kg de olivas)	8.3b	1.20b
Aceite en los subproductos (kg/100 kg de olivas)	2.80a	2.42a

Los valores de cada fila seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

5.4.6. Almacenamiento

Una vez terminado el proceso de extracción del aceite, desde la recolección hasta el último paso seguido en la almazara, independientemente del procedimiento seguido para ello, hay que almacenarlo para su posterior comercialización.

5.5. Aprovechamiento integral de subproductos de la agroindustria del olivar

Derivados de los productos principales, aceituna y aceite, aparecen toda una serie de subproductos y residuos como consecuencia de las tareas de labranza y de extracción de aceite. De todos los procesos del olivar y del aceite el único residuo que no se aprovecha es la aceituna no recogida.

5.5.1. Residuos de la agroindustria del olivar

5.5.1.1. Residuos del olivo

Tronco. La madera es utilizada para la fabricación de esculturas, muebles, artesanados, vigas y utensilios, así como para leña. Las ramas se emplean como carbón o picón y con las varetas del olivo se hacen cestos y canastos.

Hojas. Se emplean como material estructurante en procesos de compostaje y vermicompostaje, así como alimento de ganado o con usos terapéuticos.

5.5.1.2. Residuos derivados de la tecnología de extracción del aceite de oliva

La industria del aceite de oliva genera importantes cantidades de subproductos y/o residuos (orujos de tres fases o dos fases, alpechines y alpeorujos) cuya gestión supone un grave problema medioambiental y económico para los profesionales del sector del olivar.

Aguas de lavado

Las aguas de lavado de aceitunas, de lavado de aceite y de la limpieza de almazaras pueden utilizarse en riego, aunque deben ajustarse en su composición a una serie de valores y cumplir el requisito de aviso previo y una limitación al esparcimiento en el terreno de $30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ cada siete días. Esta agua no deben superar los siguientes parámetros: pH 6-9; sólidos en suspensión: 600 mg/kg, DBO: 2000 mg/kg y DQO: 2500 mg/kg (Martínez Nieto *et al.*, 2003).

Alpechín

Los alpechines presentan una elevada carga contaminante y su eliminación siempre ha constituido un grave problema medioambiental, de hecho desde 1983 en España está prohibida la descarga directa de los alpechines en lugares públicos (ríos, balsas, etc).

La composición del alpechín es: 83-96% de agua, 3,5-15% compuestos orgánicos y 0,5-2% de sales minerales. La fracción orgánica está compuesta por azúcares (1-8%), compuestos nitrogenados (0,5-2,4%), ácidos orgánicos (0,5-1,5%), grasas (0,02-1%) y fenoles y pectinas (1-1,5%) (Camurati *et al.*, 1984).

El alpechín debido a su alta demanda química orgánica y al contenido fenólico, su aplicación puede ocasionar problemas de contaminación ambiental (Fiestas Ros de Ursinos y Borja Padilla, 1992; Ehaliotis *et al.*, 1999). Muchos estudios han divulgado los efectos fitotóxicos y antimicrobianos del alpechín y productos derivados debido a su contenido en fenoles y ácidos grasos (Hamdi *et al.*, 1992; Della Greca *et al.*, 2001; Linares *et al.*, 2001). Además, experiencias realizadas con alpechín indican que la mayoría de sus componentes quedan retenidos en el suelo modificando sus características químicas, físicas y biológicas (González *et al.*, 1993; López *et al.*, 1993; Martín Olmedo *et al.*, 1994). Sin embargo, debido a las grandes cantidades de materia orgánica y macronutrientes, sobre todo potasio el alpechín puede ser considerado útil como enmendante y fertilizante (Marsilio *et al.*, 1990; Palliotti y Proietti, 1992, Bonari *et al.*, 1993).

Se ha realizado un notable esfuerzo científico y técnico dirigido a reutilizar, directamente o previa transformación (deseccación en balsas, compostaje mezclado con otros residuos orgánicos), estos efluentes con fines agroganaderos o industriales (Paredes *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002; Garcia-Gomez, 2003). Uno de los tratamientos más estudiados es la digestión biológica anaerobia, sin embargo, la efectividad de dicho tratamiento no es satisfactorio, en concreto, con respecto a la fracción fenólica del alpechín, que puede inhibir la microflora anaerobia (Borja *et al.*, 1995). También han sido investigados algunos pre-tratamientos químicos que eliminan los compuestos fenólicos y facilitan los posteriores tratamientos biológicos. Entre ellos, la ozonación es una prometedora tecnología puesto que el ozono es un potente oxidante capaz de realizar una degradación oxidativa de muchos compuestos orgánicos, fácilmente disponibles, solubles en agua (Rice, 1981). Se ha demostrado que existe una correlación entre la decolorización del alpechín y la reducción del carbono orgánico total y los compuestos fenólicos (Boominathan *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1994; Sayadi *et al.*, 1995., Vincinguerra *et al.*, 1995). El pigmento del alpechín

fue caracterizado como una mezcla de moléculas catecolmelanínicas unidas a azúcares, procedentes de la polimerización subsiguiente a la oxidación enzimática de o-difenoles, quizá debido a la elevada actividad catecolásica de los tejidos de la aceituna y a su elevado contenido en o-difenoles (Ragazzi *et al.*, 1967; Goupy y Fleuriet., 1986). Se demostró que la mayoría del color del alpechín era debida a sustancias aromáticas de alto peso molecular (Sayadi *et al.*, 2000). El uso de hongos caracterizados por su eficiencia ligninolítica y por su alta capacidad de degradar compuestos relacionados con la lignina, como los polifenoles, representa una buena perspectiva de biorremediación del alpechín (Archibald *et al.*, 1990; Bergabuer *et al.*, 1991; Sayadi *et al.*, 1995; Zervakis *et al.*, 1996; D'Annibale *et al.*, 1998). Por otro lado, puede ser compostado usando varios agentes de relleno (Galli *et al.*, 1997; Madejón *et al.*, 1998; Paredes *et al.*, 2000), incluyendo el procesamiento de residuos sólidos del olivar (Vlyssides *et al.*, 1999). También se ha propuesto una solución con bajos costes para la detoxificación de alpechín, basado en la inmovilización de éste en polímeros superabsorbentes SAP (Dias *et al.*, 1999).

Existe la posibilidad de usar el alpechín como un material crudo para obtener antioxidantes (Chimi *et al.*, 1998), pigmentos (Sánchez-Villasclaras *et al.*, 1995), compuestos farmacológicos, etc. Actuales investigaciones apuntan a comparar diferentes métodos para la extracción de componentes activos biológicamente del alpechín y evaluar las actividades *in vitro* antioxidantes de los extractos resultantes (Visioli, 1999). Uno de los compuestos más interesantes que se ha obtenido del alpechín y de aguas de lavado es el hidroxitirosol (Capasso *et al.*, 1994; Visioli *et al.*, 1999; De Castro y Brenes, 2001).

Todavía existen dudas sobre la biodegradabilidad de estos efluentes, además, las soluciones propuestas no siempre han resultado satisfactorias, principalmente por la dificultad técnica y los costes relativamente elevados de tratamiento que no siempre son sostenibles por el sector.

Orujos y alpeorujos

Desde la aparición de los nuevos sistemas de extracción de aceite mediante centrífuga de dos fases, el panorama de la gestión de los subproductos en las almazaras ha cambiado. Así, con los anteriores sistemas de tres fases que generaban aceite, alpechín y orujo, el principal problema era el alpechín al que se le intentó buscar multitud de aplicaciones mediante sistemas de depuración y reciclaje. El problema viene cuando el sistema de dos fases se implanta a una velocidad inusitada en las almazaras. Este nuevo sistema genera solamente aceite y una sustancia con

unas propiedades intermedias entre el alpechín y el orujo de tres fases, que se denomina orujo de dos fases. La parte sólida procedente de la molturación de la aceituna, el orujo, denominada así en el sistema tradicional y de tres fases y alpeorujo en el sistema de dos fases tiene una humedad media de 50 y 60-70% respectivamente (Hermoso *et al.*, 1994).

Los orujos y alpeorujos presentan una elevada carga contaminante. El alpeorujo seco y extractado tiene un contenido medio de humedad del 13,9%, pH ligeramente ácido y un contenido de materia orgánica del 87,7% de la que casi el 50% son ligninas y 0,91% de grasas. Además, el alpeorujo contiene toda la carga contaminante del alpechín (azúcares, pectinas, polifenoles). El alpeorujo se caracteriza por su alta relación C/N, debido a que su contenido en N-Kjeldahl es del 1%, así como por su contenido en P (0,41%) y K (2,93%) (Cabrera *et al.*, 2002). El 50% de la concentración de materia orgánica del alpeorujo corresponde a azúcares reductores (Proietti *et al.*, 1995). Los componentes del alpeorujo dependerán de la variedad de las aceitunas, del tiempo de cosecha y de los métodos de procesamiento (Karapinar y Worgan, 1983). El color negro característico del alpeorujo es debido a la polimerización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y está químicamente relacionado con los derivados de la lignina (Pérez *et al.*, 1987).

Estos residuos presentan una elevada carga contaminante por lo que es necesario buscar posibles métodos de reutilización o valorización.

Los usos de orujos y alpeorujos más importantes que hasta la fecha se conocen son:

1. Extracción de aceite de orujo

Una de las formas de aprovechamiento más utilizada es la extracción del aceite de orujo a partir de estos residuos. Así, estos residuos son sometidos a una segunda extracción, ya no por medios físicos sino mediante disolventes químicos, en concreto el hexano. Esta operación se realiza en las extractoras que generalmente están en un lugar distinto a la ubicación de la propia almazara. El subproducto resultante es el alpeorujo seco y extractado u orujillo en el que el porcentaje de aceite es muy bajo y presenta una humedad del 10-13%.

En los últimos años ha surgido una polémica sobre los efectos perjudiciales del consumo de aceite de orujo, ya que durante el proceso de refinado y probablemente debido a la utilización de disolventes y a las temperaturas alcanzadas durante el proceso, se producen benzopirenos, compuestos dañinos para la salud humana.

2. Generación de energía térmica y eléctrica

En los últimos años, varios programas nacionales e internacionales están apoyando la mejora y desarrollo de formas de producción y usos de la biomasa como recurso para la generación de calor y energía eléctrica. La generación de energía mediante el aprovechamiento de residuos constituye una fuente de energía renovable y limpia que además contribuye a la conservación del medio ambiente gracias al reciclado de productos de desecho como los que origina la industria oleícola.

Las 3.200.000 t/año de orujo que se generan en el proceso de obtención del aceite de oliva constituyen la materia prima para diversos procesos industriales, que pueden ir encaminados a la generación de energía térmica y eléctrica. La empresa oleícola El Tejar es una cooperativa andaluza pionera en la experiencia del aprovechamiento de toda la biomasa resultante del olivar, en una primera etapa, y desde su creación, del alpeorujo y más recientemente en la utilización rentable de la ingente cantidad de biomasa resultante de las labores de poda del olivar (hojas y ramas). Dicha empresa creó la primera central térmica del mundo en generar energía eléctrica empleando como biocombustible el alpeorujo en el año 1995 y posteriormente diversas empresas han seguido esta iniciativa, existiendo actualmente en Andalucía 7 plantas que generan 75,4 MW. La previsión es lograr en 2010 una potencia instalada de biomasa de 250 MW. Los principales problemas respecto a la utilización de la poda de olivar en la generación eléctrica son de acopio, logística y aprovisionamiento. Por otro lado, las ventas de orujillo y hueso de aceituna a países europeos capaces de pagar mejores precios pueden llegar a desestabilizar el mercado interior. Otro grave problema es la generación de cenizas que son abandonadas en vertederos sin haberse encontrado vías de reutilización de las mismas.

3. Abonos orgánicos estables

Para dar respuestas a los problemas de grandes cantidades de alpeorujos existentes y la falta de fuentes de materia orgánica, surgen iniciativas dentro del sector de la agricultura ecológica donde se opta claramente por la valorización de este subproducto como abono aprovechando sus propiedades fertilizantes, objetivo de la presente memoria de Tesis Doctoral. De esta manera, se pretende que un subproducto con problemas de eliminación que generaba costes añadidos se convierta en una fuente de recursos.

Los orujos secos y extractados tienen naturaleza lignocelulósica, con una elevada relación C/N, muy resistentes a la biodegradación, con escaso contenido en

nutrientes y materia orgánica escasamente humificada (Nogales, 2001). Puesto que el uso directo del alpeorujó al suelo tiene un efecto perjudicial en la estabilidad estructural del suelo (Tejada *et al.*, 1997) se opta claramente por la valorización de este subproducto como abono aprovechando sus propiedades fertilizantes. En base a resultados anteriores obtenidos al compostar diferentes residuos y subproductos del sector olivarero como método para la preparación de fertilizantes orgánicos del suelo y enmiendas (Cegarra *et al.*, 1996; Madejon *et al.*, 1998a; Vitolo *et al.*, 1999; Filippi *et al.*, 2002; Paredes *et al.*, 2002), se planteó utilizar el compostaje con hongos seleccionados como una opción de bajo coste y mínimo impacto ambiental, para el aprovechamiento del alpeorujó.

4. Alimento de pequeños rumiantes

Los orujos secos y extractados son materiales lignocelulósicos y su utilización como fuente de nutrientes para rumiantes puede estar limitada por la presencia de compuestos fenólicos de carácter antinutritivo. Esta limitación puede superarse con la utilización de agentes bloqueantes como polietilenglicol (PGE), la suplementación con nitrógeno o su utilización por especies de rumiantes con baja sensibilidad a la presencia de esos compuestos como es el caso del caprino y ovino (Martín *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2003).

5. Aplicación industrial

Existe la posibilidad de utilizar el alpeorujó como material para obtener antioxidantes. Así se han obtenido cantidades de hidroxitirosol de 1,9-2,3 kg por cada 1.000 kg de alpeorujó (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002). El hidroxitirosol es un potente antioxidante (Galli y Visioli, 1999; Manna *et al.*, 1999) que es comparable con antioxidantes sintéticos comerciales como BHT (2,6- di-tert-butil-p-hidroxitolueno) y BHA (3-tert-butil-6-hidroxianisol) (Chimi y Sadik, 1988).

Además de aprovechar el potencial farmacéutico de los polifenoles, por su utilidad como antioxidantes y como antimicrobianos, se pueden obtener biopolímeros tipo polihidroxialcanoatos (PHA_s) y exopolisacáridos de origen microbiano (EPS_s), a partir tanto del alpechín como del alpeorujó (Cormenzana y Monteoliva-Sánchez, 2000; Aguilera, 2001). Además se ha descrito que el alpeorujó podría ser utilizado como aditivo alimentario si se eliminan previamente los compuestos fenólicos mediante biorremediación (Giannoutsou *et al.*, 2004).

Otros residuos

Las cenizas de cogeneración de los orujos de dos fases son un subproducto de la combustión del orujo y aunque de forma aceptada se eliminan en vertederos, pueden ser una enmienda para añadir al suelo o enriquecer mezclas de otros materiales orgánicos a compostar.

Los huesos de aceituna triturados suelen ser utilizados para la obtención de carbón activo, aunque también se han realizado estudios para ver la posible utilización de los huesos triturados como sustrato para cultivos hidropónicos (Melgar *et al.*, 2001).

La empresa El Tejar ha patentado una tecnología denominada Almazara 2.000, que consiste en la separación previa de los diversos componentes de la aceituna, pulpa, piel y hueso, para obtener posteriormente el aceite contenido en la pulpa y un nuevo residuo. Parte de los huesos triturados se utilizan para la obtención de carbón activo, que se lleva a cabo en la empresa carbonos Activos S.A.

Pese a los avances obtenidos en los últimos años, todavía existen dudas sobre la biodegradabilidad de estos efluentes, además, la dificultad técnica y los costes relativamente elevados de tratamiento que no siempre son sostenibles por el sector dificultan los procesos de biodegradación hasta ahora planteados. El previsible aumento de la generación de alpeorujo exige la búsqueda de soluciones que permitan su valorización. Una de las vías que de momento tiene una aplicabilidad sería su uso en agricultura para lo cual este subproducto debe ser previamente estabilizado y biotransformado con objeto de obtener enmiendas orgánicas estables, que eviten los efectos nocivos sobre el suelo y los cultivos vegetales que estos pueden generar.

6. Transformación de alpeorujo seco y extractado

Es importante la utilización del alpeorujo como fertilizante pero para ello es necesario transformarlo eliminando las propiedades fitotóxicas. Los principales componentes de los residuos que con su degradación contribuirían a la disminución de fitotoxicidad son: lignina, pectinas, polifenoles.

Los residuos procedentes de la aceituna presentan como componentes principales de la pared celular lignina, celulosa, pectina, hemicelulosa y lípidos.

6.1. Componentes y bioquímica de degradación de alpeorujo seco y extractado

6.1.1. Lignina

Estructura

Las ligninas son heteropolímeros de unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de enlaces que presentan una estructura tridimensional muy compleja con un bajo grado de degradabilidad (Higuchi, 1990; Zabel y Morrell, 1992). El polímero de lignina es quizá más resistente a la degradación enzimática que cualquier otra sustancia producida por las plantas; es insoluble en agua, lo cual limita su biodisponibilidad a los agentes ligninolíticos y determina que la ligninólisis sea un proceso lento (Hammel 1997).

Bioquímica de degradación

La ligninólisis es un proceso complejo en el que intervienen una serie de reacciones de carboxilación, demetoxilación y fijación de residuos nitrogenados. La depolimerización de la molécula de lignina comprenden una serie de etapas enzimáticas en las que se generan radicales libres y otras químicas donde reaccionan dichos radicales (Zabel y Morrell, 1992).

En el proceso de lisis, la lignina se libera de la unión glucósido con los hidratos de carbono (con la hemicelulosa sobre todo) y se produce la ruptura de las cadenas propílicas y la apertura de los núcleos aromáticos con la formación de compuestos de la serie alifática y su posterior mineralización; si no existe la ruptura, se produce la liberación de compuestos fenólicos simples, que pueden ser degradados u oxidados directamente a policondensados prehúmicos (Bonneau, 1987).

La mayor parte de la lignina existente en la naturaleza es degradada y utilizada por los hongos de la pudrición blanca (Messner, 1998; Kapich *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Jaoauni *et al.*, 2005). Tres son los principales enzimas degradadores de lignina aislados de estos hongos: manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP) y lacasa (Silva, 2002). Otros enzimas importantes en la degradación de la lignina son enzimas que producen peróxido de hidrógeno para ayudar a la acción catalítica de las peroxidases (como glucosa oxidasa y glioxal oxidasa), enzimas que pueden participar en la ruptura de los fenoles, aldehídos, otros derivados de la lignina (como quinona oxidoreductasa), o hidrocarburos aromáticos policíclicos y enzimas que previenen la acumulación excesiva de peróxido de hidrógeno y enzimas pertenecientes a los ciclos Redox de las hidroquinonas (como catalasa, superóxido

dismutasa, glutatión peroxidasa). Sin embargo cada uno de los hongos degrada la lignina utilizando una maquinaria enzimática diferente, así *P. chrysosporium*, uno de los hongos más estudiados, secreta LiP y MnP mientras que *Dichomitus squalens* y *Ceriporiopsis subvermispora* degradan la lignina sin detectarse LiP (Périé y Gold, 1991; Jensen *et al.*, 1996) y el hongo *Pycnoporus cinnabarinus* produce solo lacasa y aunque carece de LiP y MnP degrada lignina eficientemente (Eggert *et al.*, 1996b, c; Bermek *et al.*, 1998). La implicación directa de estas enzimas en el proceso degradativo de la lignina, fue establecida cuando se descubrió que el fluido extracelular de cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium* contenía al menos un enzima que degradaba lignina (Glenn *et al.*, 1983; Tien y Kir, 1983).

Manganeso peroxidasa

Se denomina también peroxidasa dependiente de Mn(II) y cataliza oxidaciones de un electrón en compuestos fenólicos y no fenólicos, específicamente de Mn²⁺ a Mn³⁺ (Glenn *et al.*, 1986), el cual es responsable de la oxidación de la lignina y de varios compuestos modelo de lignina fenólicos y no fenólicos (Hammel *et al.*, 1989; Wariishi *et al.*, 1989; Popp y KirK, 1991). El sustrato primario es Mn (II) que se oxida a Mn(III) y es estabilizado formando complejos con ácidos orgánicos (Messner, 1998).

A pesar de que esta enzima ha sido encontrada en casi todos los estudios con hongos de pudrición blanca, su función exacta y las reacciones químicas que llevan a cabo en la oxidación de lignina aún no están claras. La adición de MnO₂ sólido a cultivos de *P. chrysosporium* al inicio de la actividad ligninolítica, incrementó la producción y la estabilidad de las LiPs, (Kern, 1989) por lo que sugiere que este podría ser el papel de la MnP en la degradación de la lignina en la naturaleza.

Se han observado los efectos de activación de la producción de enzimas ligninolíticos tanto en cultivos líquidos (Ardon *et al.*, 1996; Crestini *et al.*, 1996) como sólidos (Elisashvili *et al.*, 1998) en extractos de plantas que contienen fenoles. Así, estudios realizados con alpechín mostraron que su adición a cultivos líquidos condujo a un incremento de la producción de oxidasas modificadoras de la lignina en *L. edodes* (Vinciguerra *et al.*, 1995), *Pleurotus ostreatus* (Martirani *et al.*, 1996) y *Phanerochaete chrysosporium* (Kissi *et al.*, 2001).

Lacasa

Las lacasas son enzimas del tipo fenoloxidasas ampliamente distribuidas entre animales, plantas y microorganismos (Mason, 1955). Esta enzima cataliza cuatro

oxidaciones de un electrón de la mayoría de los compuestos fenólicos, formando radicales fenoxi libres como intermediarios (Messner, 1998). Presenta una amplia especificidad de sustrato respecto al donador electrónico y cataliza la oxidación de muchos compuestos fenólicos e incluso no fenólicos, aunque con más dificultad, en presencia de algunos intermediarios (Bourbonnais y Paice, 1990; Eriksson *et al.*, 1990; Thurston, 1994; Youn *et al.*, 1995); Call y Mücke 1997). Se especula que la lacasa puede reaccionar indirectamente con componentes de lignina no fenólica por mediación de especies fenólicas presentes en la naturaleza (Have y Teunissen, 2001). Estos “mediadores” de la naturaleza pueden ser metabolitos (Böhmer *et al.*, 1998), o fragmentos de lignina (Thurston, 1994) producidos por otras enzimas ligninolíticas, y pueden así abrir otras alternativas como rutas de oxidación de componentes no fenólicos (Have y Teunissen, 2001).

Lacasas extracelulares son producidas en pequeñas cantidades; sin embargo, su producción pueden ser aumentadas considerablemente por una amplia variedad de sustancias, principalmente aromáticas o compuestos fenólicos relacionados con la lignina o los derivados de la lignina, como por ejemplo ácido ferúlico, 2,5 xilidina, p-anisidina o alcohol veratrílico (Leonowicz *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2001; Suguimoto *et al.*, 2001; Nyanhongo *et al.*, 2002;).

Las enzimas lacasas han sido muy estudiadas por su interés y aplicabilidad en la industria (Bajpai, 1999; Gianfreda *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999) ya que oxidan sustancias contaminantes tales como clorofenoles (Fahr *et al.*, 1999; Grey *et al.*, 1998), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Majcherezyk *et al.*, 1998), estructuras relacionadas con la lignina (Bourbonnais *et al.*, 1996), compuestos organofosforados (Amitai *et al.*, 1998), compuestos modelo lignina no fenólica (Majcherezyk *et al.*, 1999) y fenoles (Bollag *et al.*, 1998). Estudios realizados con alpechín incubado con especies de *Pleurotus* mostraron una gran capacidad de este hongo de excretar lacasa al medio de crecimiento y de eliminar compuestos fenólicos (Tsioulpas *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha observado que los diferentes compuestos aromáticos presentes en el alpechín podrían actuar como inductores potenciales de la lacasa (D'Annibale *et al.*, 2000).

6.1.2. Celulosa

Estructura

La celulosa es un polisacárido, formado por cadenas lineales de glucosa enlazadas mediante puentes de hidrógeno, estas cadenas aparecen como agregados fibrilares cristalinos que le confieren a la pared la mayor parte de su enorme

resistencia. Los espacios existentes entre las microfibrillas de celulosa pueden llenarse con pectinas y hemicelulosa y probablemente también con una cierta cantidad de lignina durante la maduración lo que reduce su accesibilidad a los enzimas celulolíticos.

Bioquímica de degradación

Las celulasas son un conjunto de β -1,4 glucanasas, entre las que destacan las endoglucanasas y exoglucanasas. Las endoglucanasas se caracterizan por la ruptura al azar de enlaces β -glucosídicos liberando glucosa, celobiosa y fracciones polisacáridicas de gran peso molecular, mientras que la actividad exoglucanasas o β -1,4-celobiohidrolasa se caracteriza por la liberación sucesiva de unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor de la cadena de celulosa (Varma, 1999). Las enzimas β -glucosidasa y celobiohidrolasa forman parte también del complejo de celulasas de algunos microorganismos.

Se ha demostrado que la producción de celulasas por varios hongos (Haltrich *et al.*, 1996), bacterias (Okeke y Paterson., 1992; Bernier *et al.*, 1983) y nematodos fitopatógenos, y se piensa que sin duda también son producidas por las plantas superiores parásitas. Los hongos saprobios, en particular ciertos grupos de basidiomicetos, y en menor grado las bacterias saprobias, causan la degradación de la mayor parte de la celulosa descompuesta en la naturaleza. Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas (Lynd *et al.*, 2002), sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como *Fusarium* (Murali *et al.*, 1994; Christakopoulos *et al.*, 1996), *Lentinula edodes* y *Pleurotus* sp. (Puntambekar 1995; Buswell *et al.*, 1996), también producen celulasas.

Se ha descrito que *Fusarium oxysporum* produce celulasas para utilizar residuos lignocelulósicos como principal fuente de carbono (Christakopoulos *et al.*, 1995a; Panagiotou *et al.*, 2003). También se ha descrito la producción de celulasas por hongos de la podredumbre blanca, por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus* crecidos en residuos agroindustriales (Jecu, 2000; Khalil, 2002).

La producción de celulasas por los distintos hongos crecidos en residuos depende además de la distinta especie de hongo utilizado de otros factores (Xiao *et al.*, 2004).

6.1.3. Sustancias pécticas

Estructura

Las sustancias pécticas son polisacáridos formados principalmente por cadenas de ácido galacturónico entremezcladas con moléculas de ramnosa y pequeñas cadenas laterales de ácido galacturónico y algunos otros azúcares.

Bioquímica de degradación

Las pectinasas o enzimas pectolíticas engloban a un grupo de enzimas depolimerasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α (1-4) de las moléculas de ácido galacturónico en las cadenas pécticas. Algunas pectinasas (poligalacturonasas) rompen las cadenas pectínicas al añadir una molécula de agua y romper (hidrolizar) el enlace entre dos moléculas de ácido galacturónico; otras (las pectinliasas o transeliminadas) rompen las cadenas eliminando una molécula de agua del enlace y rompiéndolo y liberando productos que poseen un doble enlace insaturado. Cada una de estas enzimas pueden romper las cadenas pectínicas en varios puntos al azar (endopectinasas) y liberar cadenas más cortas o romper sólo el enlace terminal (exopectinasas) de las cadenas y liberar unidades separadas de ácido galacturónico.

Se ha demostrado la presencia de poligalacturonasas en determinados hongos pertenecientes al género *Fusarium*, como por ejemplo *F. moniliforme* (Bonnin *et al.*, 2002) y *F. oxysporum* (Patino *et al.*, 1997).

Algunos estudios han mostrado que la mayoría de los residuos de la industria de la agricultura contienen pectina y otros materiales relacionados que son utilizados como fuente de carbono por algunos microorganismos (Said *et al.*, 1991). Así, en estudios realizados en pulpa de determinadas frutas se ha detectado la producción de endopoligalacturonasa por *Lentinus edodes* y *Aspergillus awamori* (Gomez-Ruiz *et al.*, 1988; Hart *et al.*, 1991; Botella *et al.*, 2004).

6.1.4. Hemicelulosas

Estructura

Las hemicelulosas la forman cadenas de azúcares sin organización fibrilar que están unidas a las microfibrillas de la celulosa mediante enlaces débiles de hidrógeno. Los polímeros hemicelulósicos son principalmente el xiloglucano, pero también lo forman glucomananos, galactomananos y arabinogalactanos. El xiloglucano es un polisacárido formado por cadenas de glucosa que llevan unidos residuos de xilosa y

en cantidades menores de galactosa, arabinosa y mucosa. El xiloglucano se une firmemente a la celulosa mediante puentes de hidrógeno (Hayashi y Maclachlan, 1984; Hayashi *et al.*, 1987) y desempeñan un papel importante en el crecimiento de la célula (Nishitani y Tominaga, 1991; Talbott y Ray, 1992b) y la maduración (Redgwell *et al.*, 1991).

Bioquímica de degradación

La enzima endo- β -1,4-glucanasa es responsable de la primera etapa de degradación de xiloglucano que se hidroliza en fragmentos de gran peso molecular, la actividad exo- β -1,4-glucanasa posteriormente libera fracciones de bajo peso molecular a partir de los extremos de la cadena de polisacáridos (Fry, 1995).

Tanto las plantas como los hongos saprobios pueden degradar xiloglucano mediante enzimas hidrolíticas y pueden utilizar los productos de esta degradación como fuente de moléculas señal (Hayashi, 1989) y como nutrientes de reserva (Fry, 1989).

Se ha detectado actividad enzimática hemicelulolítica en incubaciones con hongos de la podredumbre blanca, como el hongo *Phanerochaete chrysosporium* crecido en residuos de caña de azúcar (Khalil, 2002) así como en incubaciones con hongos pertenecientes al género *Fusarium* como *F. oxysporum* crecido en residuos del azúcar de caña (Cheilas *et al.*, 2000) o de maíz (Panagiotou *et al.*, 2003).

6.1.5. Lípidos

Estructura

En todas las células vegetales hay varios tipos de lípidos, de los cuales los más importantes son: 1) los aceites y las grasas que se encuentran en muchas células, especialmente en las semillas, donde funcionan como compuestos almacenadores de energía, 2) los lípidos céricos, que se encuentran en la mayoría de las células epidérmicas expuestas a la atmósfera y 3) los fosfolípidos y glucolípidos los cuales, junto con las proteínas, son los constituyentes principales de todas las membranas celulares de la planta. La característica común a todos los lípidos es que contienen ácidos grasos que pueden ser saturados o insaturados.

Bioquímica de degradación

Se sabe que varios hongos, bacterias y nematodos tienen la capacidad de degradar lípidos mediante enzimas lipolíticas, denominadas lipasas, fosfolipasas, etc, que hidrolizan la liberación de los ácidos grasos de una molécula lipídica. Las

lipasas, cuya denominación bioquímica es acil-ester-hidrolasas, son enzimas relativamente específicas en su actividad catalítica, algunas de ellas se distinguen por su alta estereoespecificidad, (Carey *et al.*, 1983) e hidrolizan triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos. Las lipasas se han utilizado ampliamente en medicina (enzimas digestivas), como reactivos clínicos (enzimas que hidrolizan glicéridos), como limpiadores (aditivos detergentes) (Sugiura, 1984), así como en biodegradación de plásticos, como polihidroxicanoatos (Jaeger *et al.*, 1995; Mochizuki *et al.*, 1995). Se han detectado lipasas en procesos de fermentación de diferentes residuos sólidos con los hongos *Aspergillus oryzae* (Ohnishi *et al.*, 1994) o *Penicillium restrictum* (Andreas *et al.*, 1999).

6.2. Microorganismos transformadores de alpeorajo seco y extractado

Microorganismos como los hongos saprobios pueden ser utilizados como transformadores de alpeorajo seco y extractado debido a que son capaces de degradar lignina y celulosa, así como de degradar sustancias tóxicas incluidas las fenólicas (Madrid *et al.*, 1996).

6.2.1. Bacterias

El poder de degradación de la lignina por las bacterias es muy inferior al de los hongos. Generalmente degradan la madera lentamente y debido a la falta de habilidad para penetrar, usualmente invaden las células de la madera de forma simultánea con el hongo, colonizando primero las células parenquimáticas, pudiendo también atacar las paredes de la célula una vez utilizados los contenidos de ésta. Pocas especies de bacterias pueden degradar todos los componentes de la pared celular, sin embargo, se han encontrado bacterias capaces de degradar la lignina como *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Buswell y Odier, 1987), así como varias especies de *Streptomyces* que tienen la habilidad de degradar lignina de coníferas, latifoliadas y gramíneas (Kuhad *et al.*, 1997). Hay bacterias que utilizan como única fuente de carbono, compuestos de bajo peso molecular relacionados estructuralmente con la lignina y que son capaces de romper enlaces intermonómeros característicos de este polímero, como por ejemplo, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus* y *Nocardia* (Massai *et al.*, 1991).

6.2.2. Hongos saprobios de la madera

Los hongos lignícolas pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a la naturaleza de su desarrollo en la madera y al tipo de deterioro que ocasionan. Los hongos lignívoros son los más importantes y son capaces de desintegrar las paredes de la célula y, por lo tanto, cambiar las características físicas y químicas de la madera; tal desorganización de la materia da lugar al estado llamado pudrición. En cambio, los hongos de mancha y los de mohos suelen alimentarse de los compuestos orgánicos fácilmente digeribles almacenados en la madera y con frecuencia ejercen escasa o nula influencia sobre las propiedades de ésta. Los primeros causan coloraciones que pueden clasificarse como defectos, mientras que los mohos colorean pocas veces la madera, excepto en la superficie (Hunt y Garrat, 1962).

Los hongos lignívoros o de pudrición que en la mayoría de los casos pertenecen al género *Basidiomycetes*, degradan preferentemente uno o más componentes de la madera causando tres tipos de pudrición, conocidas como pudrición blanda, pudrición parda y pudrición blanca.

Hongos de la podredumbre blanda

La pudrición blanda es la de menor importancia ya que se produce a nivel superficial. Se produce un reblandecimiento de los tejidos de la madera acompañado de una pérdida significativa de peso. Los hongos más característicos de este grupo son *Aspergillus* (Betts y King, 1991) o *Fusarium* (Anselmo y Novais, 1992; Carnicero *et al.*, 1992). Estos hongos atraviesan las paredes secundarias de las células ya lignificadas, dando lugar a cavidades cilíndricas, a través de las cuales se introduce la hifa provocando la degradación preferente de los polisacáridos y en menor extensión de la lignina (Blanchette, 1991; Buswell y Odier, 1987).

Hongos de la podredumbre parda

Estos hongos exhiben preferencia por celulosas y hemicelulosas, provocando una gran depolimerización de estos polisacáridos de la pared celular y una mínima degradación de la lignina (Buswell y Odier, 1987; Kir y Farrell, 1987), con lo que se produce una acumulación de lignina que da lugar a un color pardo al que debe su nombre. Los hongos que producen este tipo de pudrición, pertenecen a la clase *Basidiomycetes*, como por ejemplo los géneros *Lentinus*, *Poria* o *Polyporus*.

Hongos de la podredumbre blanca

La degradación de la lignina, incluye una serie de cambios oxidativos, que conducen a la progresiva despolimerización y liberación de compuestos de bajo peso molecular, que son metabolizados hasta CO₂ y H₂O (Reid y Seiferet, 1982; Chen y Chang, 1985). La degradación preferente de la lignina conlleva la acumulación de celulosa y hemicelulosa dando lugar a un color blanco al que debe su nombre.

Algunos hongos de pudrición blanca, como *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* tienen un modo de degradación de la madera no selectivo, es decir, ellos degradan celulosa, hemicelulosa y lignina simultáneamente, mientras otros como *Cerioporiopsis subvermispora* o *Phlebia tremellosa*, degradan preferentemente la lignina.

Sin embargo, estos hongos no están directamente relacionados solo con la degradación de lignina en sustratos lignocelulósicos naturales (Becker y Sinitsyn, 1993; Ataca, 1994) sino también en la degradación de varios compuestos xenobióticos (Pointing, 2001; Scheibner *et al.*, 1997) incluidos tintes (Pasti-Grigsby *et al.*, 1992; Paszczyński *et al.*, 1992; Spadaro *et al.*, 1992) así como dibenzodioxina policlorado, DDT (Bumpus *et al.*, 1985), clorofenoles (Joshi y Gold, 1993) y carbonos aromáticos policíclicos (Bezalel *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1996). Los primeros estudios de degradación de xenobióticos por hongos de la podredumbre blanca, se llevaron a cabo con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Está demostrado que este basiomicete es capaz de degradar DDT [1,1-bis(4clorofenil)2,2,2-tricloroetano], lindano (γ -hexaclorociclohexano), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y dioxinas (Aust y Benson, 1993; Bumpus *et al.*, 1985; Cameron *et al.*, 2000). Especies de *Pleurotus* pueden también degradar PAH y bifenoles clorados en cultivos con fermentación en estado líquido y sólido (Bezalel *et al.*, 1996a; Sedle *et al.*, 1993).

También se ha descrito la capacidad de estos hongos como *Pha. chrysosporium* (Sayadi y Ellouz., 1992; Sayadi *et al.*, 2000 ; Kissi *et al.*, 2001), *Pleurotus ostreatus* (Tomati *et al.*, 1991; Martirani *et al.*, 1996; Fountoulakis *et al.*, 2002) y *Lentinus edodes* (D'Annibale *et al.*, 1998) de llevar a cabo detoxificación del alpechín. Asimismo, se ha demostrado la detoxificación de mezclas de alpeorujo con astillas de madera por *Pha. chrysosporium* (Linares *et al.*, 2003).

6.2.3. Hongos saprobios del suelo

Los hongos saprobios se encuentran en la rizosfera y la rizoplana de las plantas, a partir de la cual obtienen beneficios nutricionales en forma de compuestos

inorgánicos, exudados y mucílagos de raíces vivas, así como de células muertas (Finlay y Soderstrom, 1992). La importancia de estos hongos radica en el papel que desempeñan proporcionando al suelo una gran cantidad de biomasa microbiana y en la descomposición de la materia orgánica (Domsch *et al.*, 1980; Elmholt y Kjoller, 1987). También promueve la agregación de partículas, mejorando la estructura del suelo, lo que favorece una mejor aireación del mismo que beneficia al crecimiento vegetal (Lynch y Braga, 1985). Algunos de ellos están implicados en interacciones complejas en donde intervienen fenómenos de antibiosis, fungistasis y micoparasitismo (Jeffries, 1995). El metabolismo de los hongos saprobios puede originar sustancias que promueven o inhiben el crecimiento de otros microorganismos de la rizosfera (Dix y Webster, 1995).

La degradación de la pared celular de las plantas puede ser importante para el hongo saprobio no solo para su penetración y ramificación dentro de los tejidos vegetales sino también para la liberación de los polisacáridos de la pared necesarios para su nutrición y su crecimiento (Radford *et al.*, 1996). La mayoría de los hongos saprobios producen una amplia gama de enzimas, capaces de depolimerizar los polisacáridos de la pared celular de la planta. Muchos de estos enzimas son extracelulares dirigidos a las glucoproteínas y se inducen cuando el hongo entra en contacto con la pared celular de la planta (De Lorenzo *et al.*, 1997). Los hongos patógenos sintetizan y producen grandes cantidades de enzimas degradativos de la pared celular para penetrar dentro de los tejidos de las plantas y su regulación se ha estudiado de forma extensiva (Deising *et al.*, 1995). Por el contrario, los hongos saprobios producen grandes cantidades limitadas de enzimas hidrolíticos para digerir la celulosa y usarla como fuente de carbono (Mendgen y Deising, 1993). Muchos hongos saprobios producen enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de hongos fitopatogénicos incluidos las especies no patógenicas de *Fusarium*, después de la inducción con sustratos adecuados (Bull *et al.*, 1966; Mandeel *et al.*, 1991; Ridout *et al.*, 1986).

Los hongos saprobios tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de fuentes carbonadas, desde azúcares simples, como hexosas o pentosas, hasta moléculas más difíciles de degradar como ácidos orgánicos, disacáridos, pectina, celulosa y lignina, que es particularmente resistente a la degradación bacteriana. El nitrógeno que utilizan proviene mayormente del amonio o nitrato, aunque también pueden utilizar proteínas, ácidos nucleicos u otros compuestos nitrogenados.

Hongos del genero *Fusarium* pueden degradar carbohidratos y pectina en la madera; de hecho se han caracterizado diferentes enzimas implicadas en la degradación de celulosa, hemicelulosa y pectina (Alconada y Martínez 1994). El hongo

es considerado como saprófito, es capaz de crecer y sobrevivir largos períodos de tiempo en la materia orgánica del suelo (Burgess *et al.*, 1981). Este hongo se caracteriza por una alta producción de celulasa (Christakopoulos *et al.*, 1995a) y xilanasas (Christakopoulos *et al.*, 1996) en cultivos de fermentación usando residuos lignocelulósicos como fuente de carbono.

Se ha demostrado que hongos pertenecientes al género *Fusarium* y aislados de aguas residuales de la extracción del aceite de oliva o de otros sustratos contaminados pueden degradar y transformar la lignina y compuestos derivados de la lignina (Regalado *et al.*, 1997; Saparrat *et al.*, 2000). Los hongos saprobios al igual que los de la podredumbre blanca tienen la capacidad de mineralizar la lignina mediante enzimas que incluyen peroxidasa ligninolítica (Lignina peroxidasa, Manganese peroxidasa, Lacasa) y enzimas responsables de la producción de H₂O₂ (Norris, 1980; Regalado *et al.*, 1987). Estas enzimas presentan una variedad de sustratos específicos (Hofrichter y Fritsche 1996) y están relacionadas con diferentes aspectos de la fisiología del hongo (descomposición de polímeros de plantas, detoxificación de compuestos fenólicos, pigmentación conidial, morfogénesis y patogénesis) (Binz y Canevascini 1996; Heinzkill y Messner 1997). Debido a la falta de especificidad relacionada con la depolimerización y mineralización de la lignina, los hongos son importantes organismos en los procesos de biorremediación (Field *et al.* 1993). Así, el uso de hongos caracterizados por su eficiencia ligninolítica y por su alta capacidad de degradar compuestos relacionados con la lignina, como los polifenoles, representa una buena perspectiva de biorremediación del alpechín (Archibald *et al.*, 1990; Bergabuer *et al.*, 1991; Sayadi y Ellouz, 1992).

Material y métodos

MATERIALES Y METODOS

1. Características y composición del alpeorujo seco y extractado

Se ha utilizado el alpeorujo seco y extractado procedente de la empresa oleícola Sierra Sur S.A. (Granada). En dicha empresa se utilizan las nuevas tecnologías en el proceso de obtención del aceite de oliva, sustituyendo las prensas hidráulicas por la técnica de centrifugado de masas, concretamente con el sistema de extracción de dos fases.

1.1. Tratamiento de la muestra

Las muestras de alpeorujo se autoclavarón durante tres ciclos de 20 min a una temperatura de 120°C. El material autoclavado se conservó posteriormente en recipientes herméticos a una temperatura de 4°C hasta su posterior utilización.

1.2. Determinaciones analíticas del alpeorujo seco y extractado

En el alpeorujo seco y extractado inicial y el producto final obtenido tras el proceso de biorremediación se efectuaron los siguientes análisis:

- pH (M.A.P.A., 1986)

Medido en el extracto metanólico en una relación alpeorujo:metanol 80% (1:15) con un pHmetro modelo Crison.

- Carbono orgánico total

Se realizó en un analizador de carbono total modelo Primacs-SC por detección de C mediante infrarrojos. El análisis de carbono total se realiza por combustión total de la muestra y el de carbono inorgánico total por oxidación con ácido fosfórico. El carbono orgánico total (COT) se obtiene por diferencia de ambos.

- Carbono extraíble total

La extracción de las sustancias húmicas se realizó mediante una solución 0,1 M de $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ a pH 7,1, para lo cual 2 g de las muestras de alpeorujo se agitan durante 24 h a 37°C con 40 ml de la solución extractante, se centrifugan a 800 $\times g$ durante 15 min y el sobrenadante se filtra con un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro. El carbono contenido en el extracto constituye el carbono extraíble total (CET) y se determinó

mediante oxidación ácida con dicromato puro, en la que 1 ml de extracto, 0,098 g de dicromato potásico y 4 ml de ácido sulfúrico se calentaron a 150°C durante 30 minutos y tras reposar la mezcla de oxidación durante 24 horas se adicionaron 5 ml de agua destilada y se valoró en espectrofotómetro Shimadzu UV Mod. 680 a 590 nm.

- Ácidos húmicos y ácidos fúlvicos

El fraccionamiento del carbono extraíble total se realizó por acidificación del extracto a pH 2,0 con ácido sulfúrico, centrifugación a 2.300 ×g durante 15 min y separación del precipitado (ácidos húmicos;AH) del sobrenadante (ácidos fúlvicos;AF).

El contenido de carbono de las distintas fracciones obtenidas (AH, AF) se determinó mediante oxidación ácida con dicromato puro y posterior valoración en espectrofotómetro Shimadzu UV Mod.680 a 590 nm.

- Nitrógeno, Fósforo, Potasio y Sodio

El análisis se realizó mediante la técnica descrita por Mingorance (2002). Las muestras de alpeorujo se digirieron con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno en microondas abierto de acuerdo con los Métodos del Comité Analítico. Nitrógeno y fósforo se determinaron por colorimetría utilizando un analizador automático de aire segmentado de flujo continuo (Bran+Luebbe TRACCS 2000, Bran+Luebbe, GMBH, Norderstedt, Germany) mientras que potasio y sodio se determinaron por fotometría de llama (Jenway Ltd. PFP7, Essex, UK).

- Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc Cadmio, Níquel, Cobalto y Plomo

El análisis se realizó mediante la técnica descrita por Mingorance (2002). Los elementos en el mineralizado se determinaron por espectrometría de absorción atómica (Parking-Elmer 5000, Connecticut, USA).

- Color

La medida del color del alpeorujo se realizó con un espectrómetro BYK-Gardner modelo 9000 (Silver Spring, MD) según la "Comission International de l' Eclairage" C.I.E. (CIE, 1986). La extracción de las muestras de alpeorujo seco y extractado se realizó triturándolas en mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo homogéneo. Se tomaron 2 g del polvo resultante y se lavó 6 veces con 30 ml de una mezcla metanol:agua (80:20 v/v) a 0°C. Tras los sucesivos lavados se recogieron los correspondientes sobrenadantes por centrifugación a 12.000 ×g durante 5 min y se concentraron con rotavapor, una vez eliminado el metanol la solución acuosa restante

se enrasó a 25 ml en un matraz aforado y se midió en espectrofotómetro. El color se expresó en función de los parámetros L^* , a^* y b^* , determinados a partir de los valores de absorbancia obtenidos. El parámetro L^* corresponde a la medida de la luminosidad, desde la opacidad (0) hasta la transparencia (100); el término a^* está relacionado con la escala comprendida entre la variedad de colores rojos ($+a^*$) y verdes ($-a^*$) y el término b^* corresponde a la escala de colores comprendida entre amarillos ($+b^*$) y azules ($-b^*$).

- Componentes fibrosos

La determinación de los componentes fibrosos se realizó según el esquema de fraccionamiento de Van Soest (Goering y Van Soest, 1970) que comprende el análisis de fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente.

Fibra neutro detergente (FND)

El material celular soluble se extrae, por ebullición de la muestra durante 1 h, en una solución detergente neutro de lauril sulfato sódico que contiene EDTA disódico. Los componentes solubles se separan de aquellos cuya fermentación microbiana requiere un tiempo más prolongado. El material insoluble en detergente neutro y libre de cenizas, constituye la fibra neutro detergente (FND).

Fibra ácido detergente (FAD)

Corresponde al residuo, constituido fundamentalmente por lignocelulosa, que se obtiene tras someter la muestra a una digestión con solución de detergente ácido (2% de bromuro de cetiltrimetilamonio en ácido sulfúrico al 30%) y posterior calcinación a 550°C, en horno mufla.

El contenido de **hemicelulosa** se obtiene por diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra neutro y ácido detergente de la muestra, expresado en materia seca.

Lignina ácido detergente (LAD)

Es la fracción de la pared celular vegetal, constituida fundamentalmente aunque no exclusivamente, por lignina. El residuo que resulta de la incubación de la muestra con detergente ácido, se sumerge en ácido sulfúrico al 72% durante 3 h. Pasado este tiempo, se lava con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado sea neutro, se aclara con acetona, se deseca al aire y se completa la desecación, en estufa de ventilación forzada, a $103\pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente, se pesa y se incinera en horno de mufla a 550°C. El residuo libre de cenizas constituye la fracción denominada **lignina ácido detergente**.

La **celulosa** se obtiene por diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra ácido detergente y lignina ácido detergente de la muestra correspondiente, expresados en relación a la materia seca.

Lignina polimérica precipitable en ácido (APPL)

El análisis se realizó mediante la técnica descrita por Crawford y Pometto (1988). La extracción de las muestras de alpeorujo seco y extractado se realizó tomando 1 g de alpeorujo al que se le añadieron 10 ml de agua acidificada (pH 4,5), manteniéndose en agitación durante 4 h a 15°C, filtrando posteriormente la mezcla obtenida.

2. Características del suelo empleado

Como soporte para el crecimiento de las plantas se utilizó suelo procedente de la finca experimental de la EEZ, CSIC, Granada. Se trata de un suelo franco que presenta las características descritas en el siguiente esquema.

Este suelo, antes de ser utilizado, se sometió a un doble tamizado, el primero se realizó con una criba de 1 cm de luz de malla para eliminar partes gruesas y el segundo con 4 mm de luz de malla, con lo que se obtenía el suelo en condiciones óptimas de manipulación para los ensayos de invernadero. Tras el proceso de tamizado, se mezcló con arena de cuarzo en proporción 2:3 (v:v). Esta mezcla, se esterilizó a vapor fluente (100°C), una hora durante 3 días consecutivos. Según los experimentos que se llevaron a cabo, el suelo se reinoculó con un filtrado (Whatman nº1) de una suspensión acuosa de suelo natural o de suelo procedente del inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA, que contenía la microbiota normal, a excepción de los propágulos de la MA.

Características analíticas del suelo	
pH	8,1
Arena	35,8 %
Arcilla	20,5 %
Limo	43,6 %
Materia orgánica	1,8 %
Nitrógeno	0,3 mg/kg
Fósforo	6,2 mg/kg
Potasio	132 mg/kg

3. Plantas y condiciones de cultivo

3.1. Plantas

Se utilizaron las siguientes plantas en función del tipo de ensayo: lechuga (*Lactuca sativa*, variedad Romana), soja (*Glycine max*, variedad Merrill), tomate (*Lycopersicum esculentum*, variedad Muchamiel) y alfalfa (*Medicago sativa*, variedad Aragón).

3.2. Esterilización de las semillas

Las semillas en todos los casos se esterilizaron en superficie con hipoclorito de sodio (25 g de Cl activo/litro), durante 10 min tras lo cual se lavaron varias veces con agua estéril. Pasado este tiempo las semillas se sumergieron en agua oxigenada (H_2O_2) al 7% durante 15 min y se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Finalmente se dejaron en imbibición en agua estéril un tiempo variable en función del tipo de semillas, 30 min en el caso de alfalfa y 2 h para el resto de las semillas.

3.3. Germinación y condiciones de crecimiento

Una vez esterilizadas e imbibidas, las semillas se transfirieron a placas de Petri con papel de filtro estéril, que se mantuvieron a 28°C y en oscuridad, antes de ser utilizarlas en los distintos ensayos de invernadero. Una vez germinadas se depositaron en semilleros con una mezcla de suelo-arena-turba-vermiculita en la proporción 1:1:1:1 (v:v).

Tras la germinación y cultivo durante dos semanas en el semillero, las plántulas se transplantaron a las macetas (300 ml de capacidad), siendo para ello cuidadosamente seleccionadas en base a un desarrollo homogéneo de la parte aérea y radical. El sistema de cultivo mantenido inalterable a lo largo de los ensayos, se realizó bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 400-700 nm; 16/8 h luz/oscuridad; 25-19°C y 50% humedad relativa). Las plantas se regaron por capilaridad para no alterar las propiedades físicas del suelo. Semanalmente las plantas se fertilizaron con 10 ml de la solución nutritiva propuesta por Long Asthon (Hewitt, 1952) cuya composición es la siguiente:

	solución madre (g/l)	ml/l solución
KNO ₃	30,3	10
Ca(NO ₃) ₂	70,8	20
MgSO ₄ .7H ₂ O	18,4	20
Fe(II)-EDTA	2,5	10
MnSO ₄ .H ₂ O	2,23	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,4	0,1
ZnSO ₄ .2H ₂ O	2,9	0,1
H ₃ BO ₃	18,6	0,1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,35	0,1
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20,8	10
Agua	-	hasta 1000 ml

El pH se ajustó a 7 con una solución NaOH al 10%. La concentración de nitrógeno y fósforo se modificó según el experimento y tratamientos utilizados, así se añadió 0,5 g/l de NaH₂PO₄.2H₂O a las plantas en experimentos con micorrizas y las inoculadas con *Rhizobium* con la solución libre de N.

4. Hongos saprobios

4.1. Aislamiento de hongos saprobios

Los hongos saprobios de suelo utilizados en los distintos ensayos se aislaron a partir de muestras de suelos rizófericos de distintos hospedadores o cultivos, de las ciudades de Buenos Aires y Granada, y a partir de esporocarpos del hongo formador de micorrizas arbusculares *Glomus mosseae*. El aislamiento de los hongos saprobios se realizó mediante lavados de muestras según el método descrito por Widden y Bisset (1972). La técnica consistió en lavados de suelo o esporocarpos en un aparato que contenía varios tubos de metacrilato divididos en 3 secciones mediante filtros sucesivos de malla metálica y luz decreciente de superior a inferior. Las muestras se colocaron en el compartimento superior de cada tubo. Los tubos acrílicos se llenaron de agua estéril, haciéndose burbujear intensamente las muestras con aire durante 3 min. Al cabo de este tiempo, los tubos se vaciaron y se completaron nuevamente con

agua estéril. Estos lavados se repitieron 5 veces, cantidad necesaria para eliminar completamente la contaminación fúngica superficial (esporas, esclerocios etc), según una curva de lavado realizada previamente. Se lavaron 4 muestras por cada muestreo.

Tras el último lavado, las partículas retenidas en los diferentes filtros una vez secas, se transfirieron en forma estéril a placas de Petri con medio de cultivo agar y extracto de malta (MEA) y antibióticos. Las placas de Petri se incubaron a 28°C durante varios días y los hongos que crecieron se repicaron estérilmente en tubos de ensayo con medio de agar patata (PDA) en pico de flauta conservándolos a 4°C hasta su utilización.

Los hongos saprobios cuyo hábitat natural es la madera y que se utilizaron en los diferentes ensayos se aislaron de troncos de madera en descomposición; para ello se seleccionaron varios trozos que presentaban visualmente gran crecimiento de hongos y se colocaron directamente en placa de Petri que contenía medio de cultivo MEA. Se obtuvo un cultivo puro del hongo mediante el resembrado de una porción de él en otra placa con medio de cultivo nuevo.

La totalidad de las cepas aisladas se determinaron a nivel de género o especie según el caso, con la ayuda de las claves pertinentes (Rifai, 1969; Booth, 1971; Ellis, 1971; Carmichael *et al.*, 1980; Von Arx, 1981).

4.2. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados

Se utilizaron dos tipos de hongos para los distintos ensayos: hongos saprobios del suelo y hongos saprobios procedentes de madera, cuyas características se exponen a continuación.

Especie/cepa	Procedencia	Referencia
<i>W. inflatus</i>	Aislado de esporocarpos	Hennebert, 1962, BAFC Cult N°F8992
<i>T. koningii</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Rifai, 1969, BAFC Cult N°843
<i>T. harzianum</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Samuels, 1996, BAFC Cult N°153
<i>Pa. farinosus</i>	Aislado de esporocarpos	Samsom <i>et al.</i> , 1974, BAFC Cult N°F8846
<i>Pe. brevicompactum</i>	Aislado de suelo de Granada	Samsom <i>et al.</i> , 1976
<i>Pe. chrysogenum</i>	Aislado de suelo de Granada	Domsch <i>et al.</i> , 1980
<i>Pl. ostreatus</i>	Aislado de madera de álamo	Domsch <i>et al.</i> , 1980
<i>F. oxysporum 3</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Scldtl, 1824, BAFC Cult N° 3
<i>F. oxysporum 738</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Scldtl, 1824, BAFC Cult N° 738
<i>F. graminearum</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schuwabe, 1839, BAFC Cult N° 122
<i>F. concolor</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Reinking, 1934, BAFC Cult N°2183
<i>F. lateritium</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Nees, 1817, BAFC Cult N° 2317
<i>Pha. chrysosporium</i>	Aislado de madera de pino	Burds, 1972, ATCC N° 24725
<i>C. rígida</i>	Aislado de madera de haya	Berk. & Mont., 1991, CECT 20449
<i>Pl. pulmonarius</i>	Aislado de madera latifoliadas	Quel., 1872, CBS 50785
<i>Py. cinnabarinus</i>	Aislado de madera de haya	Jacq, 1881, CECT 20448
<i>Ph. radiata</i>	Aislado de madera de roble	Fr., 1821, CBS 18483
<i>Po. subvermispora</i>	Aislado de madera de haya	Pilat, 1940, CBS 34763

4.3. Medios y condiciones de cultivo de hongos saprobios

El cultivo de hongos saprobios se llevó a cabo en medios esterilizados en autoclave a 120°C durante 20 min. Los hongos saprobios se inocularon en placas de Petri con medio MEA al que se añadieron los antibióticos estreptomycin (5 µg/l) y

tetraciclina (2,5 µg/l) previamente esterilizados por filtración con filtros Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro y se incubaron a 28°C durante una semana.

Medio MEA	
Extracto de Malta	2 g
Peptona	2 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 4,7	

4.4. Proceso de incubación del alpeorujó con hongos saprobios

Los hongos saprobios se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 g de cebada previamente cocida y esterilizada (120°C durante 20 min) durante 10 días a 28°C. Cada matraz se inoculó con 4 trozos del medio de cultivo MEA donde habían crecido los distintos hongos saprobios.

El alpeorujó seco y extractado se incubó estáticamente en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 80 g de alpeorujó estéril durante 2, 5, 10, 15 y 20 semanas a 28°C. Cada matraz se inoculó con 4 granos de cebada incubada con los distintos hongos saprobios objeto de estudio. Como controles se utilizaron matraces con alpeorujó a los que se añadió granos de cebada sin inocular.

Tras el período de incubación, el alpeorujó destinado a estudios bioquímicos se almacenó a -80°C y el alpeorujó destinado a ensayos de fitotoxicidad se autoclavó a 120°C durante 20 min, para así eliminar cualquier forma de resistencia del hongo y se almacenó a 4°C.

5. Hongos arbusculares

5.1. Tipos y características de los hongos arbusculares utilizados

Como inóculos de MA se utilizaron dos especies distintas cuya procedencia y características se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3. Tipos y características de los hongos arbusculares utilizados

Espece/cepa	Características	Procedencia
<i>Glomus mosseae</i>	(Nicol. and Gerd.) Gerdemann and Trappe (BEG 12)	Rothamsted Experimental Station (UK)
<i>Glomus deserticola</i>	Trappe, Bloss and Menge	Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (CSIC)

5.2. Inoculación de micorrizas

El inóculo utilizado fue una mezcla de suelo, esporas, micelio y fragmentos de raíces colonizados con los endofitos. Ambos inóculos presentaron características similares: 25-35 esporas/g y 60-75% de longitud de raíces infectadas.

6. Bacterias

6.1. Características de la cepa bacteriana utilizada

La bacteria utilizada en nuestros ensayos corresponde al género *Rhizobium*, especie *Sinorhizobium meliloti* y cepa GR4 (Casadesús y Olivares, 1979). Se trata de una cepa que tiene como planta hospedadora la alfalfa.

6.2. Obtención e inoculación de bacterias

El cultivo de *Rhizobium* se llevó a cabo en el medio TY (esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min) durante 24 h a 28°C hasta alcanzar su fase logarítmica de crecimiento. Una vez obtenida la suspensión de células, se centrifugó a 5000 xg durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron varias veces con agua destilada estéril. La D.O. de la suspensión bacteriana se determinó a 600 nm en un espectrofotómetro.

Medio TY	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,9 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7,0	

La inoculación se realizó añadiendo 1 ml del cultivo bacteriano de *S. meliloti* GR4 de manera homogénea directamente a las plántulas de alfalfa con una población bacteriana de 10⁶ cel/ml.

7. Cuantificación de la micorrización de la raíz

7.1. Tinción con azul tripán (TB)

La extensión del sistema radical que presentaba colonización por hongos arbusculares se tiñó mediante el método desarrollado por Phillips y Hayman (1970). Para ello, tras la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz con una solución de KOH al 10% durante 30 min a 90°C, y neutralización con HCl 0,1N durante 3 min en frío, las raíces se tiñeron con una solución de azul tripán al 0,05% en ácido láctico durante 10 min a 90°C. El azul tripán es un colorante con afinidad por la quitina (componente mayoritario de la pared fúngica), por lo que tras la tinción, las

estructuras del hongo micorrizico se observan claramente en el interior de la raíz. Las raíces teñidas se conservaron en ácido láctico para su posterior evaluación.

La cuantificación de la colonización micorrízica se realizó usando la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980). Para ello, fragmentos de las raíces teñidas se extienden al azar sobre una placa dividida en cuadrículas. Mediante el examen microscópico, se determina el número de intersecciones de los trozos de raíces con las líneas de las cuadrículas contando tanto las intersecciones micorrizadas como las que no presentan micorrización. El porcentaje de intersecciones con raíces micorrizada, con respecto al total de intersecciones contabilizadas, da una estimación del porcentaje de longitud de raíz que está colonizada.

7.2. Tinción vital de la succinato deshidrogenasa (SDH)

La actividad SDH en el micelio fúngico se detectó utilizando la técnica descrita por MacDonald y Lewis (1978), basada en la reducción de las sales de tetrazolio (amarillo, soluble) a formazán (violeta, insoluble), a partir de succinato disódico. Esta tinción nos permite identificar el tejido activo del hongo en la raíz.

Las raíces una vez lavadas se cortan en trozos de aproximadamente 0,5 cm de longitud y se dejan incubando en la solución incubadora a 25°C durante 16-18 h. Transcurrido este tiempo se elimina esta solución, las raíces se cubren con hidrato de cloral al 75% y se lleva a ebullición durante 15 min al baño maría. Transcurrido ese tiempo y tras eliminar el hidrato de cloral, las raíces se conservan en ácido láctico.

Solución incubadora	
Succinato disódico 2,5 M	1 ml
Azul de tetrazolio (4mg/ml)	2,5 ml
Tampón Tris-ClH 0,2 M pH 7,0	2,5 ml
MgCl ₂ .5 mM	1 ml
Agua destilada	3 ml

En este caso para la cuantificación del porcentaje de longitud radical micorrizada se colocan 30 segmentos de raíz, de aproximadamente 1 cm de longitud, sobre un portaobjeto y mediante su observación al microscopio (100×), se cuantifica la proporción de cada fragmento con las estructuras fúngicas coloreadas en un tono azul-violeta debido a los depósitos de formazán. Se obtiene así el porcentaje de longitud de raíz con micelio metabólicamente activo. Comparando este valor con el obtenido mediante la tinción con azul tripán, podrá conocerse qué proporción de la micorriza observada es activa.

8. Cuantificación de microorganismos en suelo

En los ensayos de fitotoxicidad realizados en el invernadero se cuantificó la población de microorganismos totales (bacterias y hongos) cultivables a lo largo del experimento. Para ello, una vez obtenidas las raíces y eliminada la mayor parte del suelo, se seleccionó aquel que estaba más íntimamente asociado a la raíz o “suelo rizosférico”. Se transfirieron 5 g de suelo a tubos que contenían 20 ml de agua estéril y se mantuvieron en agitación durante aproximadamente 2 h. Posteriormente se realizaron diferentes diluciones seriadas de los mismos y se sembraron en placas que contenían como medio de cultivo MEA. En el caso de recuento de bacterias, se añadió cicloheximida a una concentración de 100 µg/ml al medio de cultivo para evitar el crecimiento de hongos. En el caso de los medios de cultivo utilizados para el recuento de hongos, se adicionó una mezcla de antibióticos (estreptomicina:tetraciclina; 0,5%:0,25%) para evitar el crecimiento de bacterias. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 y 72 h, para el crecimiento de bacterias y hongos respectivamente.

Después del período de incubación se realizó una aproximación cuantitativa de la población bacteriana y fúngica mediante conteo de la totalidad de microorganismos viables (TVC), expresando los resultados en n° colonias/g suelo.

9. Identificación molecular de bacterias del suelo

Con el fin de realizar una aproximación estructural sobre la heterogeneidad de la población bacteriana del suelo procedente de los diferentes ensayos de fitotoxicidad, se llevó a cabo una electroforesis del ADN bacteriano en gradiente de temperatura (TGGE).

9.1. Extracción de ADN bacteriano de suelo

La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de purificación de ADN de suelo descrita por Porteous *et al.*, (1997). Esta se realizó en varios pasos con objeto de purificar y limpiar el ADN y así, poder eliminar la mayor cantidad posible de sustancias húmicas. Para la extracción se pesaron 500 mg de suelo en tubos de centrífuga de 2 ml a los que se añadieron 925 μ l de tampón de lisis SDS (NaCl 0,25 M, Na₂EDTA, SDS 4%) y 75 μ l de isotiocianato de guanidina (GY). Se agitó vigorosamente durante 1 min y se mantuvo en baño de ultrasonido durante 2 min.

Esta mezcla posteriormente se incubó 1 h a 68°C y se centrifugó a 13.000 \times g durante 15 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido, se le añadieron 75 μ l de acetato de potasio 5 M y 250 μ l de polyetilenglicol 8000 40%, así como 10 μ g de glicógeno. Esta mezcla se precipitó a -20°C durante al menos 1 h y después se centrifugó a 13.000 \times g, durante 15 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 900 μ l del tampón CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 2%, NaCl 1,4 M, Na₂EDTA 0,1 M), se mantuvo en baño de ultrasonido durante 1 min y se incubó 15 min a 68°C. Posteriormente y tras añadir 900 μ l de cloroformo, se agitó la mezcla y se centrifugó a 13.000 \times g durante 10 min. La solución acuosa de ADN se precipitó con 1 ml de isopropanol a -20°C durante 15 min como mínimo y se recogió mediante centrifugación a 13.000 \times g durante 15 min a 4°C. El precipitado resultante se disolvió en 450 μ l de acetato de amonio 2,5 M al que se añadió 1000 μ l de etanol 95%. Esta mezcla se precipitó de nuevo manteniéndola al menos 15 min a -20°C, tras lo cual se centrifugó a 13.000 \times g durante 15 min a 4°C.

El precipitado obtenido se resuspendió en 450 μ l de tampón tris-acetato (TAE) 0,04M pH 8,0 con Na₂EDTA 0,001 M. La mezcla obtenida se filtró con Microcon-100 (Amicon, Beverly, MA, USA), para eliminar las impurezas residuales de nuestra muestra (ácidos húmicos), retener y concentrar fragmentos de cadena doble de ADN mayores de 125 nucleótidos. Se realizaron tres lavados con 450 μ l de tampón TAE y un lavado con el tampón Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 y Na₂EDTA 0,001 M (TE), con estos filtros, mediante centrifugaciones a 500 \times g durante 15 min. Por último se lavó el filtro y ajustó el volumen con el tampón TE.

9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de un fragmento de ADN bacteriano extraído del suelo mediante la técnica de PCR, se preparó una mezcla en un volumen total de 25 μ l conteniendo de 10 a 1000 ng del ADN molde, 0,2 μ M de cada uno de los

cebadores, 2,5 µl de deoxinucleósidos trifosfato 2 mM, 2,5 µl de tampón de PCR 10× conteniendo MgCl₂ 1,5 mM, 2,5 µl de albúmina de concentración 20 mg/ml y 1 unidad de la enzima Taq polimerasa. La mezcla se cubrió con 25 µl de aceite mineral. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Robocycler™ 40 de Stratagene y el programa desarrollado se basó en los cebadores utilizados. Dicho programa consistió en una primera etapa de desnaturalización del ADN molde donde la mezcla de reacción se incubó a 94°C durante 5 min. Posteriormente se realizaron las extensiones utilizando un programa que consiste en 28 ciclos a 94°C durante 1 min (desnaturalización), 1 min de anillamiento a 5 grados Celsius por debajo de la temperatura de fusión de los cebadores (unión), seguido por 2 min a 72°C (extensión). Tras esta etapa se finalizó el programa con 10 min adicionales de extensión a 72°C.

Tras realizar la primera PCR, se tomó 1 µl de esta reacción y se llevó a cabo una segunda amplificación del fragmento de ADN mediante Nested PCR. Para ello se preparó una mezcla en un volumen total de 25 µl conteniendo los mismos reactivos de la primera PCR con la única modificación de sustituir la albúmina por 2 µl de acetamida 50%.

Los productos resultantes de las reacciones de PCR, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Secuencias de cebadores empleados

L1378

5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'

GC-U984

5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAA
CGCGAAGAACCTTAC-3'

9.3. Electroforesis de ADN bacteriano

La separación y detección de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles sumergidos de agarosa (SIGMA tipo I), preparados en tampón TBE. Como solución de carga se utiliza sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl de solución de ADN:1 µl solución carga.

Tampón 10× TBE (g/100 ml)	
Tris	10,8 g
Na ₂ EDTA	0,95 g
H ₂ BO ₃	5,4 g
pH 8,2	

La concentración de agarosa utilizada fue 1,5%, ya que el ADN bacteriano de nuestro estudio corresponde al rango de separación 0,2-3 kpb. El sistema de cubetas utilizado fue el de farmacia-LKB con geles de 0,5×7×10 cm que se corrieron a 100 V. Para determinar el tamaño molecular de las bandas de ADN se utilizó el marcador de peso molecular de 0,1 kpb (Amersham Biosciences).

La visualización del ADN en el gel de agarosa se realizó mediante tinción con bromuro de etidio. Los geles se sumergieron 15 min en agua a la que previamente se habían añadido unas gotas de solución de bromuro de etidio (1 mg/ml). Posteriormente se observan las bandas de ADN en un transiluminador con luz UV de 260 nm. La fotografía de los geles se realizó mediante el sistema Gelprinter (TDI).

9.4. Electroforesis de ADN bacteriano en gradiente de temperatura (TGGE).

La técnica consiste en un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente de temperatura que permite, separar fragmentos de ADN de longitud idéntica pero distinta secuencia.

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida de 1mm de espesor, según las instrucciones del suministrador Biometra®. Se utilizaron geles cuya composición se detalla a continuación:

Composición de geles de electroforesis	
Urea	32,46 g
Agua	15 ml
Glicerol	1,59 ml
Tampón Tris-Acetato TAE (50×)	1,35 ml
Formamida desionizada	13,5 ml
Acrilamida (5%)	8,43 ml
Filtrar y completar hasta 67,5 ml con agua	
TEMED	100 µl
APS	203 µl

Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de 130 V, durante 16 h con un gradiente de temperatura entre 45 y 60°C.

La visualización del ADN en el gel de poliacrilamida se realizó mediante tinción con nitrato de plata. Se sumergió el gel en una solución fijadora de EtOH 10%/ácido acético 0,5% y se mantuvo en agitación durante 3 min, tras los cuales se eliminó esta solución y se añadió la solución de tinción AgNO_3 0,2% manteniendo en agitación durante 15 min. Posteriormente, el gel se lavó repetidamente con agua. A continuación, se añadió la solución reveladora constituida por NaBH_4 0,001g, 0,4 ml de formaldehído 37% y 100 ml de NaOH 1,5% y tras mantenerla durante 5 min aproximadamente se lavó con agua y se añadió Na_2CO_3 0,75% manteniéndose en agitación durante 10 min. Finalmente al gel se le agregó una mezcla de EtOH 25% y glicerol 10% y tras mantenerlo en condiciones de agitación durante 7 min se lavo nuevamente con con agua y se procedió a su secado. Las bandas de ADN se observaron en un transiluminador y después se procedió al análisis diferencial de bandas de las diferentes muestras de estudio.

10. Análisis de la fitotoxicidad mediante germinación de semillas

El test de fitotoxicidad se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Zucconi *et al.*, (1981a,b) modificada, mediante la cual se realiza un ensayo de germinación “in vitro” de semillas de *Lepidium sativum* L., comúnmente denominado “berro de agua”. Se determinó la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado, para lo

que se prepararon extractos acuosos tomando 3 g de dichos residuos y mezclándolos con 30 ml de agua. Dicha mezcla se mantuvo en agitación durante 2 h, se centrifugó a $9.300 \times g$ durante 20 min tras lo cual el sobrenadante se filtró en papel de filtro de $0,45 \mu\text{m}$. En placas Petri de 9 cm de diámetro se colocó un disco de papel de filtro y se añadió 1 ml del extracto acuoso de alpeorujó a distintas concentraciones, de manera que el papel quede bien empapado y finalmente, se distribuyeron al azar 10 semillas de berro. El tratamiento control se realizó con agua destilada. Para cada tratamiento se establecieron 5 repeticiones. Las semillas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 48 h, a continuación se detuvo la germinación añadiendo 1 ml de etanol a la placa. Posteriormente se contaron las semillas germinadas por placa y se determinó la longitud de la radícula de las mismas. El porcentaje índice de germinación (IG) se determinó de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas (extracto)}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas (control)}} \times 100$$

$$\text{IG} = \frac{\text{Porcentaje de germinación} \times \text{Longitud radicular (extracto)}}{\text{Porcentaje de germinación} \times \text{Longitud radicular (control)}} \times 100$$

11. Obtención y preparación de extractos enzimáticos de alpeorujó

Para el estudio de las distintas actividades enzimáticas, se llevaron a cabo dos tipos de extracciones:

Extracción A

Se realizó mediante el procedimiento descrito por Rejón-Palomares *et al.*, (1996). Las muestras de alpeorujó seco y extractado se molieron en un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino. Después se añadió polivinil polipirrolidona (PVPP) en proporción 0,15 g/g alpeorujó, para evitar que los fenoles inhiban la actividad enzimática y 0,15 mM de fenilmetilsulfonil fluor (PMSF), para inhibir proteasas. El polvo resultante se homogeneizó en el tampón de extracción A en proporción 1:3 (peso alpeorujó:volumen).

Tampón de extracción A	
Tampón tris-HCl pH 7,0	0,1 M
MgCl ₂	10 mM
β-mercaptoetanol	10 mM
Tritón X-100	0,3% (v:v)
Azida de Na	0,03% (p:v)

La suspensión obtenida se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 20.000 xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante resultante se dializó frente a 2 l de agua destilada durante 24 h a 4°C. El extracto resultante se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

Esta extracción se utilizó para la determinación de azúcares totales, proteínas y las actividades enzimáticas: endopolimetilgalacturonasa, endoglucanasa, endoxiloglucanasa, lipasa, esterasa, tanin-acilhidrolasa, manganeso peroxidasa y manganeso peroxidasa inhibida.

Extracción B

Este tipo de extracción se realizó mediante el procedimiento descrito por Críquet *et al.*, (1999). Las muestras de alpeorujo seco y extractado se molieron en un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino. El polvo resultante se homogeneizó en el tampón de extracción B en proporción 1:10 (peso alpeorujo:volumen).

Tampón de extracción B	
Tampón acetato pH 5,0	0,1 M
CaCl ₂	0,005 M
Tween 80	0,05%
PVPP	3%

La suspensión obtenida se centrifugó a 11.000 $\times g$ durante 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante se dializó con tampón acetato 0,1 M pH 5,0 durante 24 h a 4°C. Posteriormente, el extracto obtenido se concentró 20 veces mediante membranas Diaflo PM 30 (Amicon, USA).

Esta extracción se utilizó para la determinación de actividades enzimáticas exohidrolíticas.

12. Determinación de azúcares totales

La cantidad de azúcares totales se valoró según el método de la antrona descrito por Whithan *et al.*, (1971). La reacción colorimétrica se llevó a cabo en tubos de ensayo sumergidos en baño de hielo, en los que previamente se habían colocado 5 ml de reactivo de antrona. Sobre dicho reactivo y evitando que se mezcle se añadió 1 ml de la solución problema y tras una rápida agitación se calentaron a baño maría durante 10 min. Pasado este tiempo se enfriaron inmediatamente en agua midiéndose posteriormente su absorbancia al espectrofotómetro a 620 nm comparándolo con una curva patrón que se preparó con glucosa.

- Reactivo de antrona

Para su preparación se añaden lentamente 100 ml de ácido sulfúrico concentrado a 20 ml de agua destilada. En el momento de usar, se disuelven 0,2 g de antrona en 100 ml de esta mezcla.

La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) por mg de proteína y (UI) por g de alpeorujo. La actividad específica se definió como mg de glucosa liberados por mg de proteína

13. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas contenida en los extractos enzimáticos se determinó mediante la técnica descrita por Bradford (1976). La curva patrón se realizó con seroalbúmina bovina. La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo 200 μ l del reactivo de Bradford (Bio-Rad) a 5 μ l de muestra diluida hasta 800 μ l de agua. Después de agitar las mezclas, se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 5 min y se midió su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

14. Detección de actividades hidrolíticas de pared celular

14.1. Sustratos utilizados y preparación

Para la detección de los distintos enzimas hidrolíticos de la pared celular, se utilizaron compuestos solubles derivados de los polisacáridos que mayoritariamente constituyen dicha pared celular. Las distintas actividades enzimáticas se determinaron con los sustratos:

- Actividad pectinasa. El sustrato utilizado para la detección de esta actividad fue pectina (Sigma), derivado soluble procedente de cítricos.
- Actividad glucanasa. Se utilizó carboximetil celulosa sódica, CMC (Viscosidad alta, Sigma), compuesto soluble derivado de la celulosa.

- Actividad celobiohidrolasa. El sustrato utilizado para la detección de esta actividad fue avicel o celulosa microcristalina (Merck).
- Actividad xilanasa. Se utilizó xilano (Sigma)
- Actividad xiloglucanasa. Para la detección de dicha actividad se utilizó xiloglucano, un compuesto no comercial que se obtuvo a partir de semillas de capuchina trepadora (*Tropaelum majus*) mediante una modificación del método de extracción descrito por McDougall y Fry (1989).

Obtención de xiloglucano

Cien semillas de *Tropaelum majus* rehidratadas durante 18 h se homogeneizaron utilizando una "Sorval omnimixer" con 25 ml de agua destilada. Al homogenizado resultante se le añadió 450 ml de una solución de NaOH 2 M y NaBH₄ 0,05% y se mantuvo al baño maría durante 1 h con agitación cada 15 min. Esta mezcla obtenida se centrifugó a 2.000 xg durante 10 min y el sobrenadante resultante se mezcló con 990 ml de ácido acético:etanol 1:10 (v:v) y se mantuvo durante 30 min para permitir la precipitación del xiloglucano crudo. A este precipitado disuelto en 300 ml de agua destilada se le añadió 100 ml de la solución B de Fhelings [NaK(COO)₂(CHOH)₂ 1,6 M y KOH 4,45 M] y se mantuvo en agitación a 40°C durante 30 min. Tras enfriarse, al homogenizado se le añadió 100 ml de la solución A de Fhelings (CuSO₄ 0,47 M) y se centrifugó a 2.000 xg durante 10 min. El precipitado se disolvió en 300 ml de ácido acético:agua 1:4 (v:v) y el xiloglucano no acomplejado se dejó precipitar durante 12 h

añadiendo 600 ml de etanol. El xiloglucano resultante se disolvió en 200 ml de agua y se le añadió EDTA 6,7 mM, manteniéndose en agitación durante 1 h. El homogenizado resultante se volvió a centrifugar a 2.000 xg durante 10 min, tomándose de nuevo el sobrenadante para mezclarlo con 200 ml de etanol y mantenerlo en agitación durante 15 min a 4°C. El xiloglucano se lavó repetidas veces con etanol al 50%, tras lo cual se liofilizó y se conservó hasta su posterior utilización.

Todos los sustratos enzimáticos se disolvieron en tampón cítrico fosfato 50 mM pH 5 (PCA) a distintas concentraciones dependiendo de la actividad enzimática y la forma de cuantificarla. Todas las disoluciones se conservaron a 4°C durante períodos de tiempo nunca superior a 4 semanas.

14.2. Cuantificación de las actividades hidrolíticas

14.2.1. Actividades endohidrolíticas

Para la determinación de las distintas actividades enzimáticas endohidrolíticas se utilizó de forma general la técnica de viscosimetría descrita por Bateman (1963) y modificada por Rejón-Palomares *et al.*, (1996).

Se utilizó como sustrato pectina, CMC y xiloglucano, para detección de endopolimetilgalacturonasas, endoglucanasas y endoxiloglucanasas respectivamente. El fundamento de la técnica es la valoración de la pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción como consecuencia de la acción hidrolítica de los enzimas en las partes internas de las cadenas, los cuales causan una depolimerización y por tanto pérdida de viscosidad.

La mezcla de reacción consistía en 1 ml de disolución de sustrato al 1% para el caso de la actividad polimetilgalacturonasa y 0,5% para las actividades β -1,4-glucanasa y xiloglucanasa en tampón PCA 50 mM y 0,2 ml del extracto enzimático. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 37°C en jeringas de 1 ml contabilizando la pérdida de viscosidad a tiempo 0 y 30 min. Aproximadamente, 0,5 ml de la mezcla de reacción se absorbió en una jeringa de 1 ml y se contabilizó el tiempo que tardaba el menisco en bajar de la marca 0,70 ml hasta la de 0,20 ml.

La actividad se calculó en función del porcentaje de disminución de la viscosidad de la disolución de sustrato respecto al tiempo. Esta actividad se expresó en unidades de actividad específica, definida como actividad relativa (A.R.)/mg de proteína a los 30 min de reacción. El cálculo de actividad relativa se realizó en función de las siguientes relaciones matemáticas y de las medidas de T_0 y T_x .

$$A.R. = \frac{1}{T_{50}} \times 1000$$

$$T_{50} = \frac{50 \cdot T_x}{\%X}$$

$$\%X = \frac{T_0 - T_x}{T_0} \times 100$$

donde:

T_0 =Viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 0.

T_x =Viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo X (en nuestro caso 30 minutos).

T_{50} =Tiempo necesario para alcanzar una pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a un tiempo X de reacción.

$\%X$ =Pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a un tiempo X de reacción.

14.2.2. Actividades exohidrolíticas

Las actividades hidrolíticas de tipo exo se cuantificaron mediante el método descrito por Nelson (1944) y modificado por Somogyi (1952), que consiste en la determinación espectrofotométrica de los grupos reductores que aparecen como consecuencia de la actividad hidrolítica de los enzimas en los extremos de la cadena de polisacáridos que constituyen la molécula de los sustratos.

La mezcla de reacción consistió en 2 ml de disolución del sustrato al 1% en el caso de la actividad exoglucanasa, 0,5% para la actividad celobiohidrolasa y 0,25% para la actividad exopectinasa y exoxilanasa en tampón PCA 50 mM y 100 µl del extracto enzimático disuelto en 900 µl de agua destilada. Después de mezclar bien los reactivos se tomó una alícuota que se calentó a 100°C durante 5 min para detener la reacción y se centrifugó y el sobrenadante se consideró como muestra representativa del tiempo cero de la reacción. El resto se incubó durante 10 min a 37°C; tras lo cual la reacción se paró.

La reacción colorimétrica para la valoración de los grupos reductores se llevó a cabo mezclando 1 ml de la mezcla de reacción y 1 ml de la solución de tartrato alcalino de Cu, que se prepara mezclando en el momento de usar 1 vol de solución A y 25 vol de solución B. Esta mezcla se mantuvo en ebullición durante 20 min, transcurridos los cuales, se paró la reacción enfriando esta mezcla durante unos minutos. A continuación, se añadió 1 ml de la solución arseno-molibdato (solución C) que da

reacción colorimétrica y se añadieron 20 ml de agua. Cuando han transcurrido 5 min de la visualización de color se mide la aparición de grupos reductores espectrofotométricamente a 520 nm. Los grupos reductores se determinaron utilizando una curva patrón con concentraciones de glucosa como estándar. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de μ moles de grupos reducidos liberados por g de alpeorajo.

- **Solución A.** $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 15%
- **Solución B.** Se mezclan 25 g de Na_2CO_3 , 25 g de $\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 20 g de NaHCO_3 y 200 g de Na_2SO_4 . Estos reactivos se añaden a 1l de agua y después de 2 días, se clarifica de sedimentos mediante filtración con papel Whatman nº4. Se mantendrá a temperatura de 30-37°C.
- **Solución C.** Se disuelve 3 g de Na_3AsO_4 en 25 ml de agua destilada y posteriormente esta mezcla se añade a 21 ml de H_2SO_4 concentrado. Por otro lado se disuelven 25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en 500 ml de agua destilada. Ambas soluciones se mezclan bien y se incuban 30 min a 55°C.

15. Estudio de otras actividades hidrolíticas

15.1. Lipasa y esterasa

Las actividades lipasa y esterasa se determinaron según el método descrito por Giovannozzi Sermanni *et al.*, (1997). La actividad lipasa se caracteriza por hidrolizar los triglicéridos sin embargo no degradan otros compuestos lipofílicos como esteroides o ésteres mientras que la actividad esterasa puede degradar tanto triglicéridos como ésteres de esteroides.

La mezcla de reacción contenía 2 ml de tampón acetato 50 mM pH 5,0 y 50 μ l de extracto enzimático al que se le añadía 0,1 g de beta-naftilmiristato (disuelto en n-propanol) para la actividad lipasa y 0,2 g de beta-naftilacetato (disuelto en acetona) para la actividad esterasa. La reacción enzimática se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 30 min. Pasado este tiempo a la mezcla de reacción se le añadieron 20 μ l de Fast Blue 0,095 M disuelto en dimetilsulfóxido DMSO y se mantuvo a 37°C. A continuación a la mezcla de reacción se le añadieron 3 ml de acetato de etilo y 1 ml de etanol y para facilitar la separación de la fase orgánica e inorgánica 100 mg de NaCl_2 . Posteriormente, se midió la densidad óptica de la fase orgánica superior a 540 nm en

espectrofotómetro. Al mismo tiempo y siguiendo idéntica metodología, se realizaron curvas patrón, con beta-naftol, respecto a las que se cuantificó la actividad hidrolítica.

La actividad enzimática lipasa o esterasa se expresó en unidades internacionales (UI) referidas a mg de proteína y a g de alpeorujo. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima producida por μmol y por min.

15.2. Tanin-acilhidrolasa

La actividad tanin-acilhidrolasa se determinó de acuerdo con el método descrito por Sharma *et al.*, (2000). Es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces tipo éster de taninos hidrolizables y compuestos galatos.

La mezcla de reacción empleada para la determinación de la actividad tanin-acilhidrolasa contenía 100 μl de extracto enzimático a los que se añadió 150 μl de tampón acetato 50 mM pH 5,0 y 100 μl de NaF 20 mM. Tras la incubación durante 5 min a 37°C se añadieron 250 μl de ácido metil gálico 10 mM disuelto en tampón acetato 50 mM pH 5,0 y 300 μl de rodanina (2-tioxo-4-tiazolidinona) (0,667% en metanol). La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C y posteriormente se añadieron 200 μl de KOH 0,5 M y 4 ml de agua destilada. A continuación y tras la incubación durante 5 min, a la mezcla de reacción se le midió la cantidad de ácido gálico liberado a una densidad óptica de 520 nm y comparándolo con una curva patrón realizada con ácido gálico.

16. Determinación de las actividades fenol oxidasas

16.1. Manganeso peroxidasa

Las actividades manganeso peroxidasa y manganeso peroxidasa inhibida se determinaron según el método descrito por Saparrat *et al.*, (2000). Dicha enzimas catalizan oxidaciones de un electrón en compuestos fenólicos y no fenólicos; el sustrato primario es Mn (II) que se oxida a Mn(III) y es estabilizado formando complejos con ácidos orgánicos.

La mezcla de reacción para la determinación de la actividad manganeso peroxidasa y manganeso peroxidasa inhibida contenida en 50 μl de extracto enzimático a los que se añadió 790 μl de tampón malonato 50 mM pH 4,5, 20 μl de rojo fenol 0,1% y 7,6 μl de agua oxigenada al 10%. A la mezcla de reacción se le adicionó 100 μl MgSO_4 0,01 M o 100 μl EDTA 10 mM para la determinación de la actividad manganeso peroxidasa o manganeso peroxidasa inhibida respectivamente.

Posteriormente, esta mezcla se incubó durante 30 min a 37°C, pasados los cuales la reacción se paró con 50 µl de NaOH 1 M y se midió en espectrofotómetro a 520 nm.

16.2. Lacasa

Para la determinación de la actividad lacasa se utilizó el método propuesto por Saparrat *et al.*, (2000), basado en la oxidación del 2,6-dimetoxifenol (DMF). Esta enzima cataliza cuatro oxidaciones de un electrón de la mayoría de los compuestos fenólicos, formando radicales fenoxi libres como intermediarios.

Se pesó 1 g de alpeorajo en tubos de ensayo de 15 ml a los que se añadieron 10 ml de agua. Los tubos se colocaron en placa agitadora a temperatura ambiente durante un período de 3 h. Posteriormente, estos se centrifugaron a 9.300 ×g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se dializó frente a agua durante 12 h a 4°C. El extracto enzimático resultante se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

La determinación de la actividad lacasa se basa en evaluar el incremento de unidades de absorbancia, a 469 nm, a través del transcurso de la reacción mediante cinética enzimática ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía:

Reactivos	[Final]	µl
Acetato 200 mM, pH 5,0	100 mM	500
DMF 50 mM	5 mM	100
Muestra		100
Agua		300

Las actividades enzimáticas fenol oxidasas se expresaron en unidades internacionales (UI) por mg de proteína y g de alpeorajo. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima producida por µmol del sustrato oxidado por min.

17. Determinación de las actividades enzimáticas involucradas en la descomposición de la materia orgánica

17.1. Fosfatasa

La actividad fosfatasa se midió según el método descrito por Nannipieri *et al.*, (1982). Se trata de una enzima hidrolasa que actúa en la hidrólisis de esteres fosfóricos, liberando fosfato inorgánico que puede ser asimilado por los microorganismos y las plantas.

La determinación de dicha actividad se realizó tomando 0,1 g de las distintas muestras de alpeorujo o 1 g de suelo al que se le añadieron 0,5 ml del sustrato p-nitrofenilfosfato (PNPF) 0,115 M y 2 ml de tampón maleato 0,1 M pH 6,5. Posteriormente, esta mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 2 h tras lo cual se extrajo el producto de la reacción PNP (p-nitrofenol) con NaOH 0,5 M y CaCl₂ 0,5 M. La cantidad de p-nitrofenil liberada se determinó a 398 nm en el espectrofotómetro comparando con una curva patrón realizada con p-nitrofenol.

17.2. β -Glucosidasa

El método utilizado para determinar la actividad β -glucosidasa fue el propuesto por Hayano y Tubaki (1985). Se trata de una enzima hidrolasa relacionada directamente con el ciclo del carbono y que actúa sobre los enlaces β -glucósidos de las grandes cadenas de carbohidratos.

Para la determinación de la actividad β -glucosidasa, a 0,1 g de alpeorujo seco y extractado o a 1 g de suelo, se le añadieron 0,5 ml del sustrato 4-nitrofenil β -D-glucopiranosido (PNFG) 0,05 M y 2 ml de tampón maleato 0,1 M pH 6,5. A continuación se incubó a 37°C durante 2 h y posteriormente se extrajo el producto de la reacción PNP (p-nitrofenol) con NaOH 0,5 M y CaCl₂ 0,5 M. Finalmente, el PNP producido se midió en espectrofotómetro a 398 nm, comparando con una curva patrón realizada con p-nitrofenol.

Las actividades fosfatasa y β -glucosidasa se expresaron en unidades internacionales (UI). Una unidad enzimática se definió como (μ moles PNP/min) por g de suelo o g de alpeorujo.

18. Determinación de los compuestos fenólicos del alpeorujo seco y extractado

18.1. Contenido en polifenoles totales

El contenido de fenoles del alpeorujo seco y extractado se determinó según el método colorimétrico descrito por Ribereau-Gayon, (1968), basado en la reducción en medio alcalino de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (reactivo Folin-Ciocalteu) por los compuestos fenólicos y la consiguiente formación de una mezcla de óxidos azules de wolframio y molibdeno que absorben la luz en una franja de 620 a 750 nm. La medida de la absorción a 725 nm es proporcional a la concentración del compuesto.

Para la determinación de los polifenoles se pesaron alícuotas de 200 mg de las muestras de alpeorujo finamente molidas, a las que se añadió 10 ml de una solución de acetona y agua en la proporción 1:1, acidificada con 5% (V/V) de ácido fórmico. El tubo que contiene la muestra se agitó e introdujo en hielo, manteniéndolo durante 10 min en baño de ultrasonidos tras lo cual se mantuvo en agitación durante 24 h a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 1.400 ×g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº4 y se mantuvo el extracto a 4°C para su posterior medición.

A 1 ml de las distintas soluciones de la curva patrón realizadas con ácido tánico, así como de las soluciones problema, se agregaron 0,5 ml de reactivo de Folin Ciocalteu y 2,5 ml de una solución de Na₂CO₃ al 20% (P/V). Esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 35 min, tras lo cual se midió su absorbancia en espectrofotómetro a 725 nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido tánico por kg de alpeorujo.

18.2. Fraccionamiento del contenido fenólico

El fraccionamiento del contenido fenólico de los extractos acuosos y con acetato de etilo de muestras de alpeorujo inoculadas o no, se realizó mediante un sistema de ultrafiltración compuesto de una membrana plana de 100 kDa PTHMK (Waters Millipore, USA) cuyo funcionamiento es de filtración y diálisis. El contenido fenólico de las fracciones de peso molecular >100 kDa y <100 kDa se determinó según el método colorimétrico descrito por Ribereau-Gayon, (1968) descrito en el apartado anterior.

La extracción de las muestras de alpeorujo seco y extractado se realizó tomando 1 g de alpeorujo al que se le añadieron 10 ml de agua acidificada (pH 4,5),

manteniéndose en agitación durante 4 h a 15°C, filtrando posteriormente la mezcla obtenida. El extracto de acetato de etilo se obtuvo acidificando el extracto acuoso (pH 2) y añadiendo 30 ml de acetato de etilo agitando la mezcla durante 1 h, separando posteriormente la fase orgánica mediante embudo separador.

18.3. Extracción, análisis e identificación de los compuestos fenólicos del alpeorujó

Para realizar un análisis completo de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujó se llevaron a cabo dos tipos de extracciones, con una mezcla metanol:agua y acetato de etilo.

18.3.1. Método 1

Proceso de extracción

Se utilizó el método propuesto por Romero *et al.*, (2002) basado en la obtención de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujó mediante extracción con metanol, purificación en columnas C₁₈ y posterior separación y análisis por cromatografía líquida de alta eficacia con detección por absorbancia con luz ultravioleta.

Una muestra de alpeorujó seco y extractado se trituró en mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo homogéneo. Se tomaron 2 g del polvo resultante y se lavó 6 veces con 30 ml de una mezcla metanol:agua (80:20 v/v) a 0°C. Tras los sucesivos lavados se recogieron los correspondientes sobrenadantes por centrifugación a 12.000 ×g durante 5 min y se concentraron con rotavapor, una vez eliminado el metanol la solución acuosa restante se enrasó a 25 ml en un matraz aforado. El extracto fenólico se purificó mediante una columna C₁₈ de 5 g de relleno (Waters Inc.) que se activó utilizando 30 ml de metanol seguidos de 80 ml de agua desionizada. La elución de los disolventes se facilitó mediante una corriente de nitrógeno. Una vez activa la columna, se depositó en ella 1,5 ml del extracto acuoso, lavado con 100 ml de agua, posteriormente se eluyeron los compuestos fenólicos con 200 ml de metanol. La solución metanólica se evaporó mediante vacío en rotavapor y se solubilizó en 1,5 ml de la mezcla metanol:agua (1:1 v/v). Finalmente la fracción se filtró con un filtro de nailon de 0,45 µm de tamaño de poro y se inyectó en el sistema cromatográfico de intercambio iónico para su posterior análisis.

Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección ultravioleta (CLAE-Uv).

Las características y condiciones del sistema cromatográfico utilizado fueron las siguientes:

- Cromatógrafo Waters 2690 Alliance que incluye una bomba cuaternaria, inyector automático y horno en el mismo equipo, todo el proceso controlado por el programa Millennium³² (Waters Inc., Milford, MA).
- Columna analítica Lichrospher 100, C₁₈, (Merck, Darmstadt, Germany) de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm.
- La separación se realizó bajo gradiente de elución, donde las fases móviles fueron agua acidificada con ácido fosfórico ajustada a pH 2,5 (A) y metanol (B).
- El flujo de elución fue de 1 ml/min, la temperatura del horno de 35°C y se inyectó 20 μl de muestra.
- La detección se realizó con un detector de fotodiodos Waters 996 midiéndose la absorbancia a λ=280 nm.

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0,0	90,0	10,0
10,0	70,0	30,0
20,0	70,0	30,0
30,0	60,0	40,0
35,0	60,0	40,0
40,0	50,0	50,0
45,0	50,0	50,0
50,0	40,0	60,0
55,0	30,0	70,0
60,0	0,0	100,0
65,0	90,0	10,0
75,0	90,0	10,0

La concentración de polifenoles se expresa mediante una recta de calibrado de soluciones estándares o de patrones aislados por cromatografía líquida semipreparativa. Los resultados se expresaron en moles por kg de orujo.

Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección por espectrometría de masas (CLAE-EM)

Se usó un equipo ZMD 4000 (Waters Inc.) con analizador cuadrupolo, interfase CLAE de ionización a Presión Atmosférica (API) con sonda tipo Electrospray (ESI). Los espectros de masas se obtuvieron en modo iónico negativo con las siguientes condiciones: voltaje capilar de 3 kV; cono de voltaje 20 V; voltaje de extracción 12 V; temperatura de desolvatación 250°C y temperatura de la fuente 80°C. El sistema cromatográfico consiste en una bomba Waters 600, un horno Waters y un detector de diodos Waters 996. El flujo generado por la bomba cuaternaria y empleado en la detección por UV fue de 1 ml/min y de sólo 0,2 ml/min en el espectrómetro de masas. El equipo se controló mediante el programa Masslynk NT 3.4 (Waters, Inc.).

18.3.2. Método 2

Proceso de extracción

Se utilizó el método propuesto por D'Annibale *et al.*, (2004) basado en la obtención de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujo mediante extracción con acetato de etilo y posterior separación y análisis por cromatografía líquida de alta eficacia con detección por absorbancia al ultravioleta.

Las muestras de alpeorujo seco y extractado se trituraron en mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo homogéneo. Se tomaron 0,5 g de polvo resultante y se le añadió 15 ml de agua acidificada con HCl 6 N a pH 2,0, manteniendo esta mezcla en agitación durante 1 h y centrifugando posteriormente durante 5 min a 12.000 ×g. Al sobrenadante recogido tras la centrifugación se le agregaron 15 ml de acetato de etilo y se realizó la separación de la fase orgánica obtenida de dicha mezcla. Este proceso de extracción con acetato de etilo se realizó tres veces. Las tres fases orgánicas obtenidas se deshidrataron con Na₂SO₄ y se secaron al vacío en rotavapor. A las muestras se le adicionó 2 mg de resorcinol como marcador interno. El residuo seco se disolvió en 2 ml de metanol y se inyectó (25 µl) en los distintos sistemas cromatográficos para su posterior análisis.

Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia de intercambio iónico (RP-HPLC)

La cuantificación del grado de degradación de los compuestos aromáticos se realizó mediante RP-HPLC. Las características y condiciones del sistema cromatográfico fueron los siguientes:

- Columna analítica Micropack 5, C₁₈, de 15 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm.
- El flujo fue variable como se indica en la tabla, la temperatura del horno de 35°C y la detección se realizó con un detector de diodo 9065 (Varian, Palo Alto USA) a λ=254 nm.
- La separación se realizó bajo gradiente de elución, donde las fases móviles fueron metanol (A) y agua acidificada con ácido acético 1% (v:v) (B)

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Flujo (ml/min)
0	10	90	0,4
3	10	90	0,5
35	60	40	0,5
40	60	40	0,5
43	10	90	0,5

Determinación por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión molecular (SEC-HPLC)

La distribución de la fracción polimérica aromática mediante peso molecular se determinó mediante HP-SEC. Las características y condiciones del sistema cromatográfico utilizado fueron los siguientes:

- Columna analítica PWXL TSK G-3000 (Supelco, Bellefont USA) de 30 cm de longitud y 7,8 mm de diámetro interno.
- El flujo fué de 1 ml/min, la temperatura del horno de 35°C, la detección se realizó a λ=282 nm y se inyectó 10 μl de muestra.
- La separación se realizó utilizando como fase móvil una solución de NaNO₃ 50 mM y LiCl 0,1 M a pH 7,0.

- La columna se equilibró con azul dextrano (< 250 kDa, $R_T=6,06$ min), ovotransferina (77 kDa, $R_T=8,15$ min), anhidrasa carbónica (30 kDa, $R_T=8,39$ min), citocromo C (12,4 kDa, $R_T=9,22$ min) y aprotinina (6 kDa, $R_T=14,22$ min).

Determinación por espectrometría de masas acoplada a cromatografo de gases (GC-MS)

La identificación de compuestos aromáticos se realizó mediante GC-MS en residuos de acetato de etilo derivatizados con N-O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida en piridina. Para ello se utilizó un espectrómetro QP-5050 (Shimadzu, Japan) equipado con una columna AT 20 (0,25 mm i.d, 25 m) (Alltech, Deefield) a 80-280°C con un programa isothermal a 80°C durante 3 min, posteriormente se incrementará cada min 7°C hasta alcanzar 280°C y finalmente se mantendrá a esa temperatura durante cinco min. La identificación de los compuestos aromáticos se basó en la comparación con los tiempos de retención y el espectro de masas de estándar puros.

Capítulo I

Análisis de la composición y fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado

1. Análisis de la composición y fitotoxicidad del alpeorajo seco y extractado

1.1. Composición química del alpeorajo

Material y métodos

La composición química del alpeorajo se determinó mediante diversas técnicas analíticas de detección de pH, conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (COT), carbono extraíble total (CET), ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF), macro y micronutrientes, color, hemicelulosa, celulosa y lignina (LAD).

Resultados

La composición del alpeorajo utilizado, determinada según las técnicas analíticas descritas anteriormente se describe en la Tabla 1:

Tabla 1. Composición del alpeorujo seco y extractado

Composición del alpeorujo	
pH	5,33
COT (g/kg)	
CET (g/kg)	215,7
AH (g/kg)	29,6
AF (g/kg)	186,1
N (g/kg)	18,72
K (g/kg)	30,54
Na (g/kg)	0,17
Mg (g/kg)	3,82
Ca (g/kg)	13,61
P (g/kg)	2,11
Fe (g/kg)	1,12
Cu (mg/kg)	68,97
Zn (mg/kg)	65,24
Mn (mg/kg)	46,51
Color L*	24,43
Color a*	2,92
Color b*	6,25
Hemicelulosa (g/100g alpeorujo)	9,97
Celulosa (g/100g alpeorujo)	17,09
LAD (g/100g alpeorujo)	24,36

COT = Carbono orgánico total; CET= Carbono extraíble total;
 AH= Ácidos húmicos; AF= Ácidos fúlvicos; LAD= Lignina ácido detergente

1.2. Determinación de la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado

1.2.1. Análisis de fitotoxicidad sobre germinación de semillas

Material y métodos

El análisis de fitotoxicidad se realizó mediante un ensayo de germinación “in vitro” de semillas de *Lepidium sativum* L., comúnmente denominado “berro de agua”. Se realizaron extractos acuosos de alpeorujo que se añadieron a placas Petri que

contenían 10 semillas de berro distribuidas al azar. Las concentraciones del extracto acuoso de alpeorujos que se añadieron por placa fueron equivalentes a la aplicación de 0,006, 0,0125, 0,025, 0,5, 0,1, 0,2 y 0,4 g de alpeorujos por placa. El tratamiento control se realizó con agua destilada y para cada tratamiento se establecieron 5 repeticiones. Se contaron las semillas germinadas por placa y la longitud de radícula tras su incubación a 25°C durante 48 h. Los resultados se expresaron en índice de germinación.

Resultados

En el test de fitotoxicidad realizado en extracto acuoso de alpeorujos seco y extractado se pudo comprobar que la adición de dicho residuo inhibe la germinación y crecimiento de semillas de berro. Observamos que cuando el porcentaje de alpeorujos presente en el extracto acuoso de dicho residuo fue pequeño (0,006-0,0125) se obtuvieron índices de germinación de 60 y 78%, sin embargo cantidades superiores a 0,1 g de alpeorujos presentes en el extracto acuoso redujeron el índice de germinabilidad por debajo del 5%. Dosis equivalentes a la aplicación de 0,4 g de alpeorujos por placa provocaron una inhibición drástica de la germinación (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de germinación de semillas de *Lepidium sativum* L. en extracto acuoso de alpeorujos.

Extracto acuoso de alpeorujos (µl)	Alpeorujos (g)	Índice de germinación IG (%)
12	0,006	75,68d
25	0,0125	61,89d
50	0,025	48,97cd
100	0,05	28,68bc
200	0,1	4,51ab
400	0,2	0,75a
800	0,4	0a

Valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

1.2.2. Análisis de fitotoxicidad del alpeorujó sobre crecimiento de plantas

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento consistió en cuatro tratamientos con alpeorujó a las concentraciones de 2,5, 5, 10 y 20 g/kg de suelo y un control sin alpeorujó. Estos cinco tratamientos se llevaron a cabo en plantas de lechuga, soja y tomate y se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Las plantas de lechuga, soja y tomate se cultivaron en macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla de suelo:arena 2:3 (v/v) no esterilizado. El alpeorujó seco y extractado previamente esterilizado se añadió a las plantas a las concentraciones de 0, 2,5, 5, 10 y 20 g/kg de suelo. La fitotoxicidad producida por el alpeorujó esterilizado fue similar a la producida por el alpeorujó sin esterilizar. En los tratamientos micorrizados se añadieron al sustrato 8 g por maceta del inóculo de *G. mosseae*. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en el invernadero y semanalmente se fertilizaron con 10 ml de la solución nutritiva de Long Asthon.

Determinaciones

Después de 30 días de crecimiento se determinó el peso seco de la parte aérea y de raíz tras secar las plantas a 70°C durante 48 h. Las raíces se dividieron en dos grupos: uno se tiñó siguiendo la técnica de tinción clásica basada en el uso de azul tripán (TB) y otro se utilizó para tinción vital histoquímica (SDH), de esta manera se pudo cuantificar desarrollo total del hongo (TB) y vivo (SDH), siguiendo la técnica de cuantificación del porcentaje de colonización radical descrita por Giovannetti y Mosse (1980).

Resultados

Los ensayos de fitotoxicidad realizados en invernadero sobre el crecimiento de plantas mostraron que la aplicación de alpeorujó seco y extractado a plantas de lechuga, soja y tomate a concentraciones de 0, 2,5, 5, 10 y 20 g/Kg de suelo disminuyó el peso seco de la parte aérea y de raíz de todas las plantas ensayadas (Fig. 1). El desarrollo de parte aérea y raíz se vio positivamente correlacionado con la

concentración de alpeorujos seco y extractado aplicado. Sin embargo, el efecto fitotóxico fue diferente según la planta utilizada, así el tomate y la lechuga se comportaron como las plantas más sensibles a la presencia de alpeorujos mientras que las plantas de soja fueron las más resistentes.

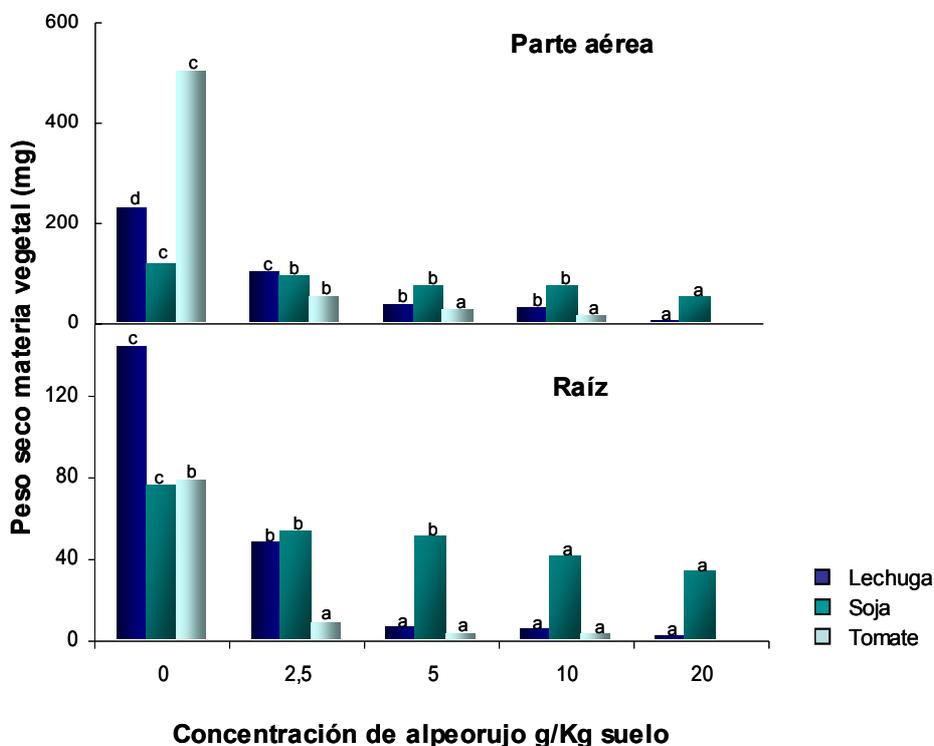


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas en suelo no estéril en presencia de distintas concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada planta denotan diferencias significativas (Duncan's. $P=0.05$).

La acción fitotóxica del alpeorujos es morfológicamente apreciable a través de una reducción del crecimiento y disminución de materia seca en todas las plantas ensayadas (Fig. 2).



Fig. 2. Plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) cultivadas sin alpeorujos (A) y en presencia de 20 g/Kg de alpeorujos (B).

La aplicación de alpeorujos a plantas de lechuga, soja y tomate afectó a los niveles de micorrización (Fig. 3).

El porcentaje de longitud de raíz colonizada de plantas de lechuga y soja crecidas en suelo no estéril, disminuyó en presencia de concentraciones de alpeorujos de 2,5, 5, 10 y 20 g/Kg. En plantas de tomate, fue necesaria la adición de 10 g/Kg de alpeorujos para modificar los niveles de micorrización.

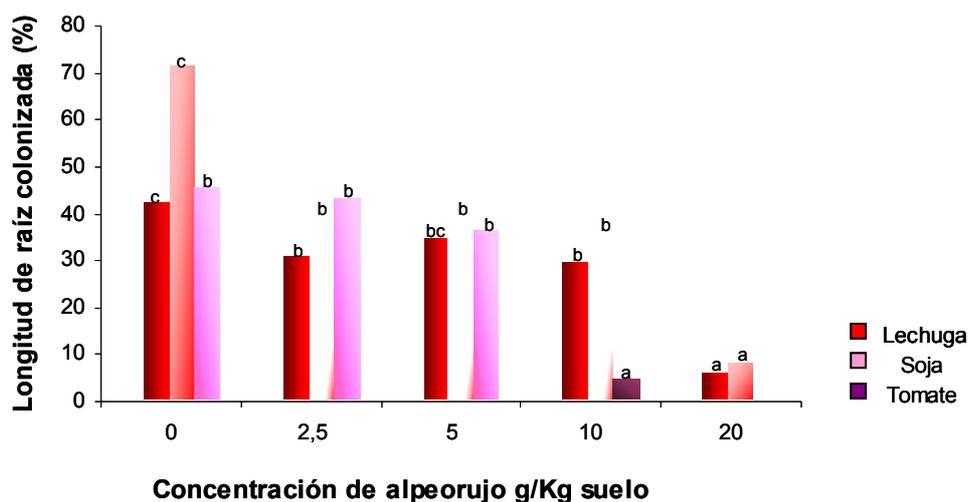


Fig. 3. Longitud de raíz colonizada en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas en suelo no estéril cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada planta denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

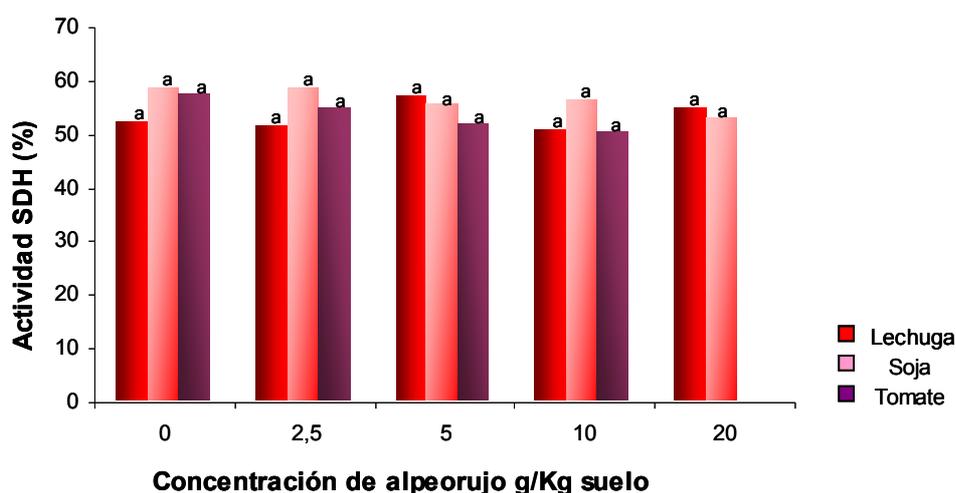


Fig. 4. Actividad succinato deshidrogenasa en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas en suelo no estéril y cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada planta denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

Las diferentes concentraciones de alpeorujo añadido a plantas de lechuga, soja y tomate no produjeron ningún efecto en la actividad metabólica del hongo MA, medido como porcentaje de micelio con actividad SDH por lo que permanece funcional y efectivo en su totalidad. Dicho resultado muestra que no existe una disminución en la actividad metabólica del hongo MA, por lo que permanece funcional y efectivo en su totalidad (Fig. 4).

Discusión

Los test de fitotoxicidad realizados con plantas de *Lepidium sativum* mostraron inhibición de la germinación y crecimiento de las semillas con la adición de extracto acuoso de alpeorujo. El alpeorujo es un residuo fitotóxico ya que adicionado en muy baja cantidad supuso índices de germinación inferiores al 60%, límite que marcan diversos autores para poder hablar de ausencia de fitotoxicidad en residuos y su posible utilización en agricultura como abonos orgánicos sin riesgo para las plantas (Zucconi *et al.*, 1981a; Riffaldi *et al.*, 1986). La causa principal de su fitotoxicidad podría ser el alto contenido en compuestos tóxicos tales como lípidos, fenoles y ácidos orgánicos de bajo peso molecular que presenta el alpeorujo, los cuales son potentes inhibidores de la germinación de las semillas (Saviozzi *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 2000). Resultados similares se observaron en el caso de otros residuos del olivar, así el alpechín redujo significativamente la germinabilidad de *Triticum durum* (Casa *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 2004). Después de la incubación del alpechín con el hongo *Lentinus edodes*, se observó un incremento significativo de la germinabilidad comparado con los controles no inoculados, indicando así que la fitotoxicidad había sido considerablemente reducida. También se observó en procesos de vermicompostaje del alpeorujo una gran eficacia en la eliminación de la fitotoxicidad al obtener valores de índice de germinación superiores al 60%. En nuestro caso, el estudio de la disminución de la fitotoxicidad mediante la incubación del alpeorujo con los hongos saprobios se realizó con análisis de biomasa vegetal.

Se ha descrito que los ácidos fenólicos inhiben la germinación de semillas (Mayer y Everani, 1952, 1953; Varga y Köves, 1959) aunque la concentración de dichos fenoles es importante, de hecho Guenzi y McCalla (1966a) mostraron que los ácidos p-cumárico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, siríngico y vainíllico sólo tuvieron efectos fitotóxicos sobre germinación de semillas de trigo cuando estos se aplicaron en concentraciones de $3,6 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Sin embargo otros autores como Williams y Hoagland (1982) estudiando los efectos de ácidos fenólicos, como ácido p-cumárico, cafeico, ferúlico y gálico en la germinación de semillas de nueve cosechas de especies

de malas hierbas observaron, en la mayoría de los casos, que la inhibición de la germinación por ácidos fenólicos no es la causa primaria de la fitotoxicidad de estos.

La falta de materia orgánica en el suelo hace necesaria la administración de abonos para mantener la capacidad productiva de dicho suelo para una correcta fertilización. La dosis recomendada de abono orgánico se ha establecido en 4 Kg m⁻² (Ocampo *et al.*, 1975). Sin embargo y debido al coste y a la poca disponibilidad de estos abonos es a veces difícil la utilización de estos abonos orgánicos. El aprovechamiento de subproductos como el alpeorajo como fertilizante orgánico contribuiría a solucionar uno de los mayores problemas que tiene planteado el sector agrario de nuestro país.

La aplicación de 20 g de alpeorajo por Kg de suelo no estéril, dosis equivalente a la recomendada como abono orgánico, produjo un descenso del peso seco de plantas de lechuga, soja y tomate.

Capítulo II

Estudio de los cambios producidos por los hongos arbusculares en la protección de la planta frente a la acción del alpeorujo

2. Estudio de los cambios producidos por los hongos arbusculares en la protección de la planta frente a la acción del alpeorujo

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se realizó en dos fases. En la primera de ellas se estudió el efecto de la inoculación de plantas con hongos arbusculares y su protección frente a la toxicidad causada por la aplicación de alpeorujo. En la segunda fase se observó la protección de las plantas previamente micorrizadas frente a la aplicación de alpeorujo. Cada una de las fases del experimento se diseñó teniendo en cuenta tres variables. La primera, el factor concentración de alpeorujo agregado al suelo con 5 tratamientos: 0 control sin alpeorujo y 2,5, 5, 10 y 20 g/kg de alpeorujo. La segunda variable consistió en el factor MA con tres factores, control sin micorrizar e inoculación con *G. mosseae* y *G. deserticola*. La tercera variable fue el tipo de planta: lechuga, soja y tomate. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

En la primera fase las plantas de lechuga, soja y tomate se cultivaron en macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla de suelo:arena tinalizado 2:3 (v/v) a las que se reinoculó con un filtrado de suelo. Se cultivó una plántula por maceta. El alpeorujo seco y extractado previamente esterilizado se añadió a las diferentes plantas a concentraciones de 0, 2,5, 5, 10 y 20 g/kg. En los tratamientos micorrizados se añadieron al sustrato 8 g por maceta de los inóculos de *G. mosseae* o *G. deserticola*. Todos los inóculos utilizados en este ensayo tenían características similares (32-35 esporas por g y 60-75% de longitud de raíz micorrizada).

Para la segunda fase experimental, las plantas de lechuga, soja y tomate se cultivaron en macetas de 40 ml de capacidad, en una mezcla turba:vermiculita (1:1) inoculándose con 4 g de inóculo de *G. mosseae* o *G. deserticola*. Se cultivaron durante 4 semanas y después se transplantaron a macetas de 300 ml de capacidad con suelo estéril. El alpeorujo seco y extractado previamente esterilizado, se añadió a las diferentes plantas a concentraciones de 0, 2,5, 5, 10 y 20 g/kg de sustrato.

Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en el invernadero a las que semanalmente se les aplicó 10 ml de la solución de Long Asthon con 0,5 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a las plantas no micorrizadas. Las plantas micorrizadas se fertilizaron con la misma solución nutritiva sin fósforo.

Determinaciones

Una vez cosechadas, tras 30 días de crecimiento, se determinó el peso seco de la parte aérea y raíz tras secar las plantas a 70°C durante 48 h. Previamente, las raíces se dividieron en tres alícuotas: una se utilizó para determinar el peso seco estableciendo la relación peso húmedo-peso seco de la alícuota con el peso húmedo de la totalidad de la raíz. La segunda alícuota se tiñó siguiendo la técnica de tinción clásica basada en el uso de azul tripán (TB). La tercera alícuota se utilizó para tinción vital histoquímica (SDH), de esta manera se pudo cuantificar desarrollo total del hongo (TB) y vivo (SDH), siguiendo la técnica de cuantificación del porcentaje de colonización radical descrita por Giovannetti y Mosse (1980).

Resultados

La adición de 10 y 20 g/Kg de alpeorujos a plantas de lechuga y soja no inoculadas con hongos micorrícicos disminuyó la biomasa aérea y radicular (Fig. 1, 2, 3). Sin embargo el peso de parte aérea y raíz de plantas de lechuga y soja no inoculadas e inoculadas con *G. mosseae* y *G. deserticola* disminuyó en presencia de todas las concentraciones de alpeorujos utilizadas (Fig. 1, 2, 3). En plantas de tomate, sin embargo, la presencia de hongos arbusculares no incrementó el efecto fitotóxico del alpeorujos (Fig. 3).

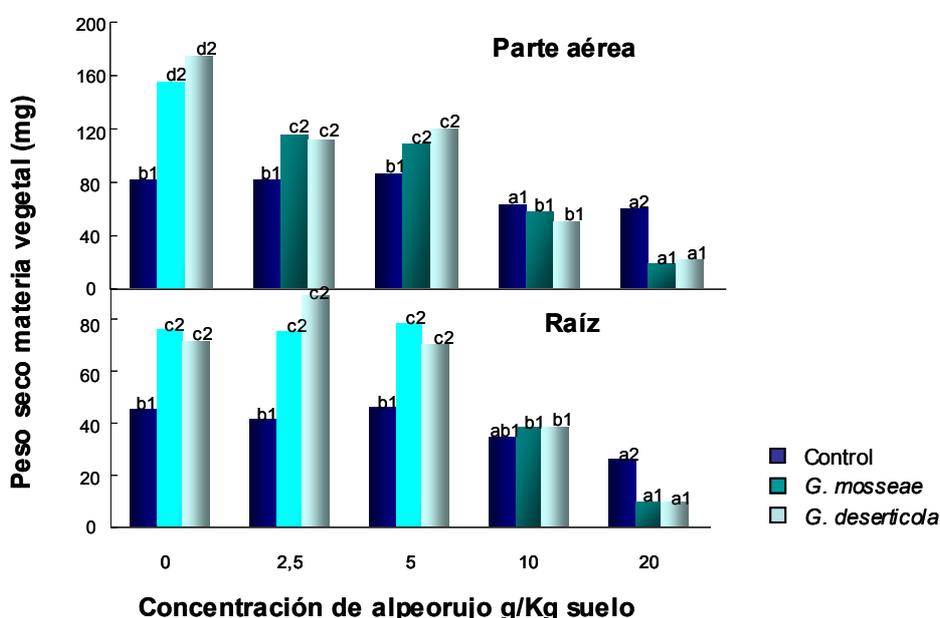


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) inoculadas o no con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

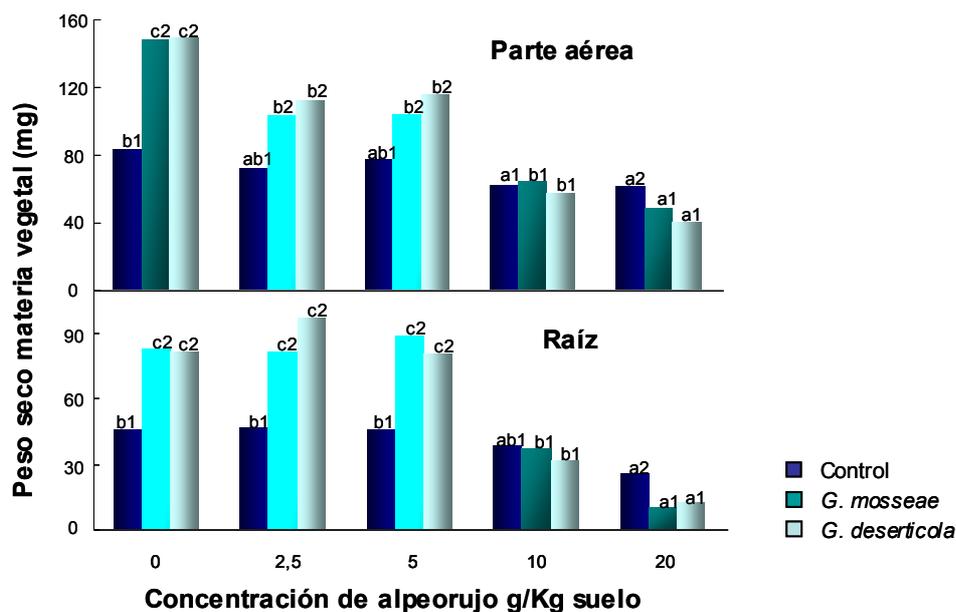


Fig. 2. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de soja (*Glycine max* L.) inoculadas o no con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. $P=0.05$).

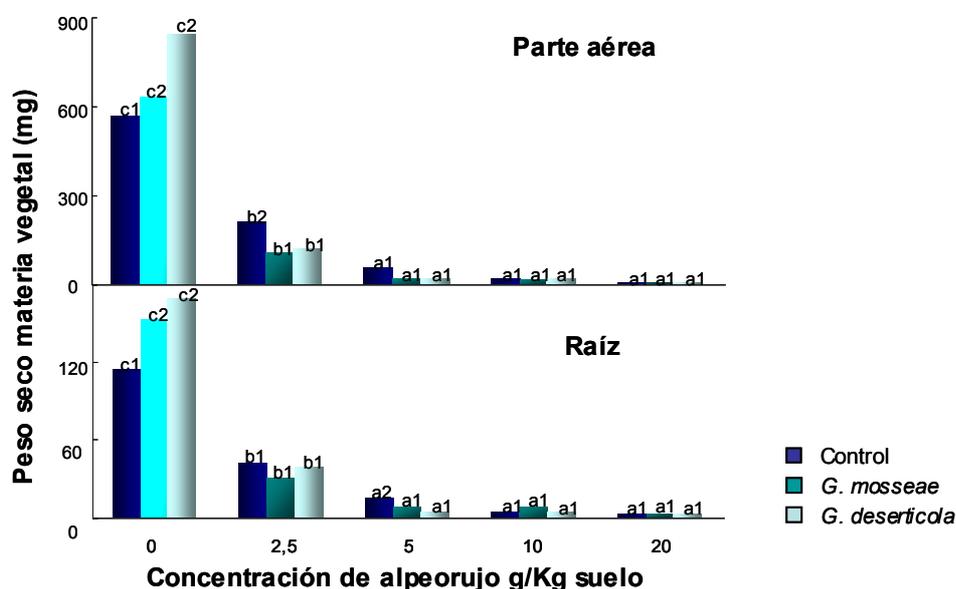


Fig. 3. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) inoculadas o no con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. $P=0.05$).

En los tratamientos en ausencia de alpeorujó, se observó un mayor desarrollo de plantas de lechuga, soja y tomate inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola*, tanto de parte aérea como de raíz, respecto a plantas control no inoculadas. Sin embargo, la inoculación con hongos MA solo aportó beneficios en los tratamientos con dosis bajas de alpeorujó en el caso de plantas de lechuga y soja. Así, podemos señalar, que los pesos secos de parte aérea y de raíz de plantas de lechuga y soja micorrizadas fueron mayores que los de plantas no micorrizadas, en presencia de concentraciones de 2,5 y 5 g/Kg de alpeorujó (Fig. 1 y 2). Estas plantas de lechuga y soja tuvieron pesos secos de materia vegetal similares cuando se añadió 10 g/Kg de alpeorujó, mientras que cuando la concentración fue de 20 g/Kg los pesos secos de plantas de lechuga y soja no micorrizadas fueron mayores que los de plantas micorrizadas. Caso especial fue el de plantas de tomate ya que la presencia de cualquier dosis de alpeorujó produjo un descenso en el peso de parte aérea y raíz similar en plantas inoculadas o no inoculadas (Fig. 3).

El porcentaje de micorrización de plantas de lechuga, soja y tomate inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola*, disminuyó en presencia de concentraciones de alpeorujó de 10 y 20 g/Kg (Figuras 4, 5 y 6). *G. deserticola* presentó los valores más altos de colonización radical en plantas de lechuga y soja controles o con dosis bajas de alpeorujó igualándose a concentraciones de 10 y 20 g/Kg. En plantas de tomate la efectividad de los hongos arbusculares utilizados fue similar.

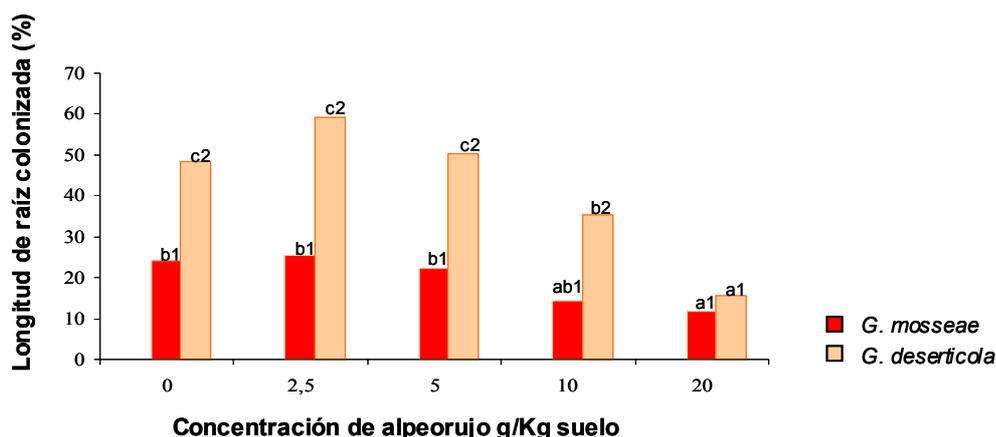


Fig. 4. Longitud de raíz colonizada en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), inoculadas con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola*, cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujó seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujó denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

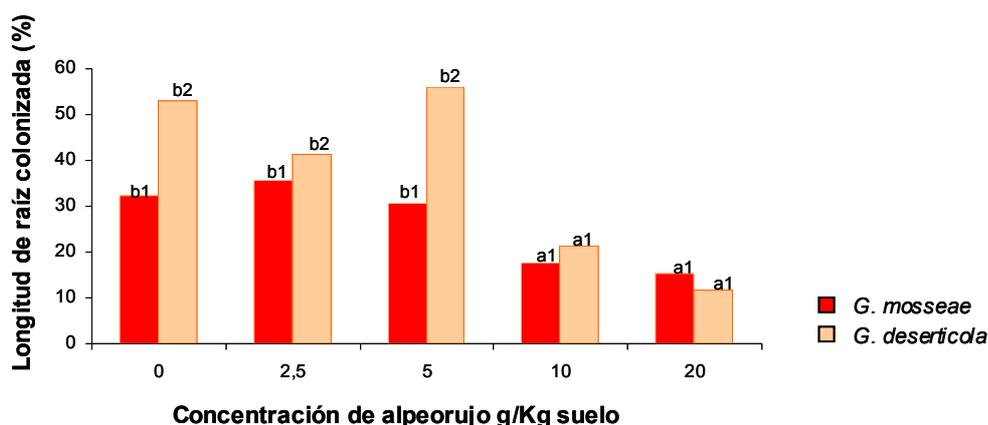


Fig. 5. Longitud de raíz colonizada en plantas de soja (*Glycine max* L.), inoculadas con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola*, cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

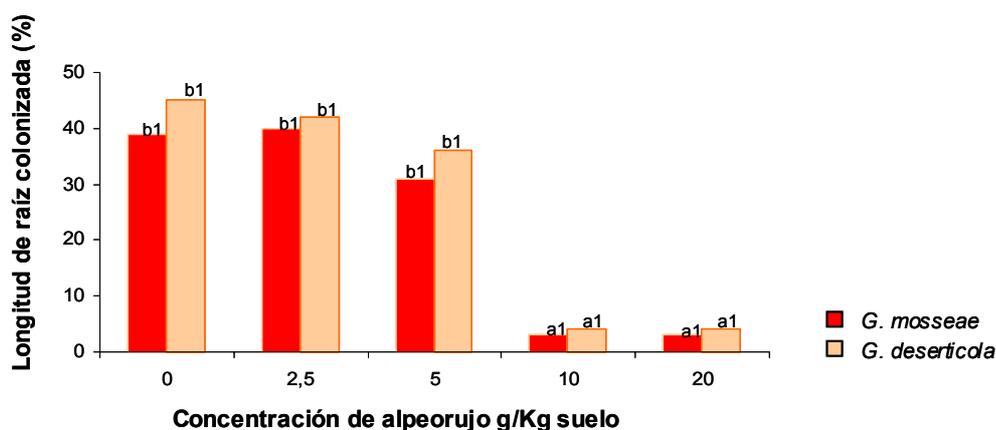


Fig. 6. Longitud de raíz colonizada en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), inoculadas con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola*, cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

Sin embargo, la presencia de alpeorujos en plantas de lechuga, soja y tomate no conllevó consecuencia sobre el porcentaje de micelio de *G. mosseae* y *G. deserticola* con actividad SDH (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad succinato deshidrogenasa en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) inoculadas con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* , cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujó seco y extractado.

Concentración alpeorujó (g/Kg suelo)	Actividad SDH (%)					
	Lechuga		Soja		Tomate	
	<i>Mos</i>	<i>Des</i>	<i>Mos</i>	<i>Des</i>	<i>Mos</i>	<i>Des</i>
0	63,4a	79,2a	67,3a	77,4a	53,9a	67,2a
2,5	62,1a	80,2a	67,2a	70,5a	52,7a	66,9a
5	73,3a	82,4a	65,2a	79,3a	51,3a	65,9a
10	60,8a	86,4a	66,4a	73,6a	50,9a	64,3a
20	63,5a	87,4a	62,7a	78,2a	50,8a	63,2a

Cada valor es la media de tres repeticiones. Los valores de cada columna seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

En una segunda fase del experimento donde se estudió la resistencia de una planta previamente micorrizada a la toxicidad del alpeorujó, se observó que la aplicación de distintas concentraciones de alpeorujó a plantas de lechuga, soja y tomate, cuatro semanas después de la inoculación de estas con *G. mosseae* y *G. deserticola* produjo una disminución del peso seco de parte aérea y de raíz de estas. Se ha observado en este caso que el peso seco de la parte aérea y de raíz de todas las plantas no inoculadas disminuyó solamente cuando se aplicaron concentraciones de 10 y 20 g/Kg (Figuras 7, 8 y 9), en cambio en el caso de la aplicación del hongo MA simultáneamente con el alpeorujó, el peso de las plantas de tomate disminuyó a todas las concentraciones de alpeorujó ensayado. Es importante destacar que para todas las dosis de alpeorujó añadido, el peso seco de parte aérea y de raíz de plantas de lechuga, soja y tomate previamente inoculadas con *G. mosseae* y *G. deserticola* fue mayor con respecto a plantas no inoculadas.

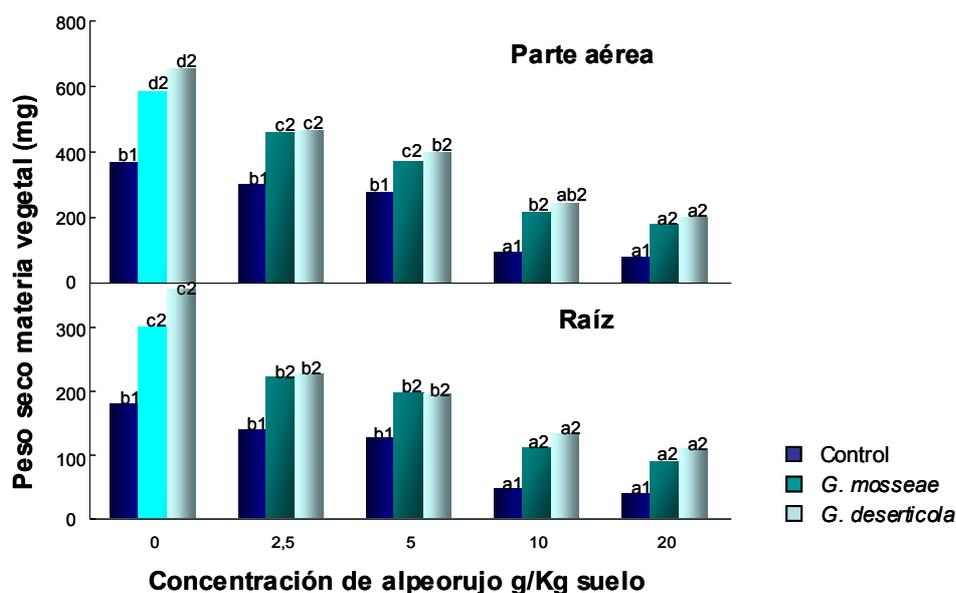


Fig. 7. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) inoculadas o no con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* cuatro semanas antes de la aplicación de las distintas concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. $P=0.05$).

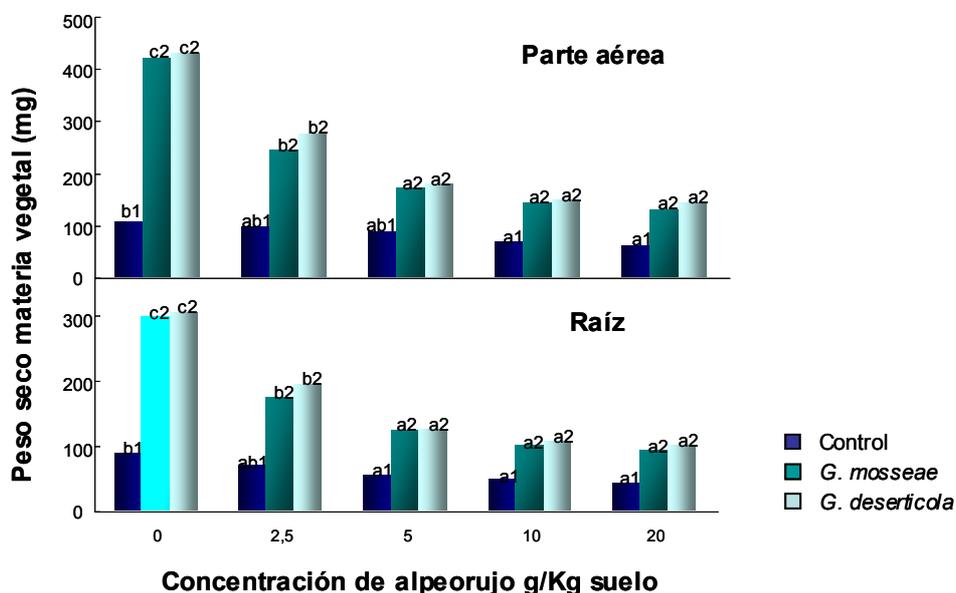


Fig. 8. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de soja (*Glycine max* L.) inoculadas o no con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* cuatro semanas antes de la aplicación de las distintas concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's. $P=0.05$).

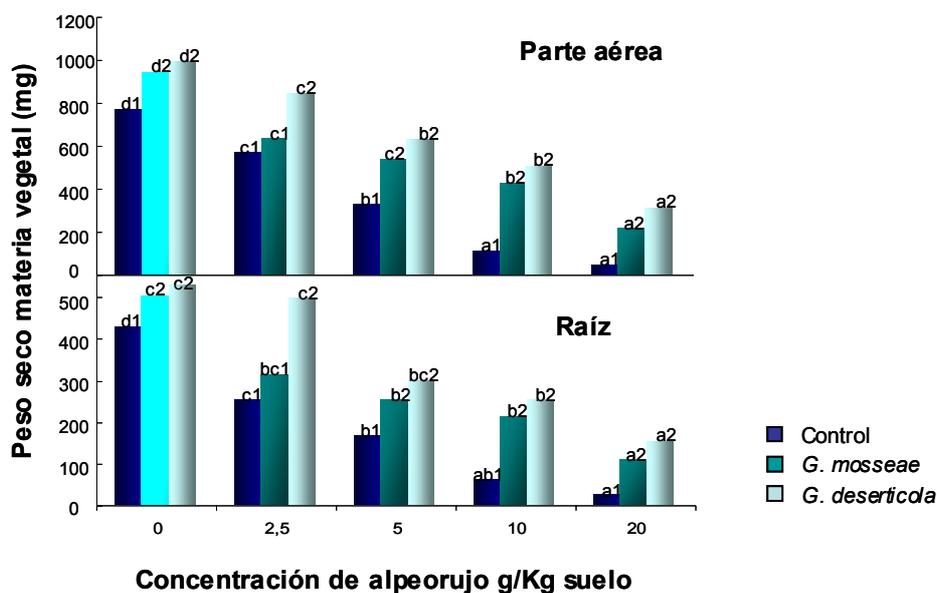


Fig. 9. Peso seco de la parte aérea y de raíz de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) inoculadas o no con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. desarticola* cuatro semanas antes de la aplicación de las distintas concentraciones de alpeorujos seco y extractado. Letras distintas en cada tratamiento y números distintos en cada concentración de alpeorujos denotan diferencias significativas (Duncan's, P=0.05).

La aplicación de alpeorujos a plantas de lechuga, soja y tomate previamente inoculadas y a diferencia de lo que ocurría en el caso de micorrización simultánea a la adición de alpeorujos, no se observó descenso de los niveles de micorrización (Tabla 3).

Tabla 3. Longitud de raíz colonizada en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) inoculadas con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola* cuatro semanas antes de la aplicación de las distintas concentraciones de alpeorujó seco y extractado.

Concentración alpeorujó (g/Kg suelo)	Longitud de raíz colonizada (%)					
	Lechuga		Soja		Tomate	
	Mos	Des	Mos	Des	Mos	Des
0	35,7a	71,3a	34,4a	82,4a	32a	49a
2,5	35,8a	60,2a	31,7a	86,2a	34a	52a
5	38,1a	75,4a	34,6a	84,3a	32a	43a
10	37,7a	70,2a	36,4a	84,6a	29a	45a
20	35,6a	74,4a	30,8a	75,9a	27a	47a

Cada valor es la media de tres repeticiones. Los valores de cada columna seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

La Tabla 4 muestra que las diferentes concentraciones de alpeorujó adicionado a plantas de lechuga, soja y tomate adicionadas cuatro semanas después de la inoculación, no influyeron en el porcentaje de micelio de *G. mosseae* y *G. deserticola* con actividad SDH.

Tabla 4. Actividad succinato deshidrogenasa en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) inoculadas con los hongos arbusculares *G. mosseae* y *G. deserticola*, cuatro semanas antes de la aplicación de las diferentes concentraciones de alpeorujos seco y extractado.

Concentración alpeorujos (g/Kg suelo)	Actividad SDH (%)					
	Lechuga		Soja		Tomate	
	<i>Mos</i>	<i>Des</i>	<i>Mos</i>	<i>Des</i>	<i>Mos</i>	<i>Des</i>
0	62,6a	60,8a	66,2a	79,6a	55,4a	67,1a
2,5	63,5a	75,3a	62,5a	84,2a	53,1a	64,3a
5	63,5a	72,3a	67,4a	88,3a	52,3a	65,3a
10	62,1a	68,7a	68,2a	85,5a	50,7a	63,4a
20	70,3a	64,6a	67,6a	82,6a	49,2a	62,9a

Cada valor es la media de tres repeticiones. Los valores de cada columna seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

El número más probable de propágulos de hongos arbusculares al inicio de los ensayos llevados a cabo fue de 15±4 en suelo no estéril, 31±7 en suelo estéril inoculado con *G. mosseae* y 52±12 en suelo estéril inoculado con *G. deserticola*. Al final del ensayo se demostró que la aplicación de diferentes concentraciones de alpeorujos no supuso una variación significativa del número de propágulos en suelo estéril o estéril inoculado con los dos tipos de hongos arbusculares utilizados (Tabla 5).

Tabla 5. Número más probable de propágulos de hongos arbusculares en suelo no estéril (SNE) o suelo estéril inoculado con *G. mosseae* o *G. deserticola* en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), soja (*Glycine max* L.) y tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) en presencia de diferentes concentraciones de alpeorujo.

Planta	Concentración alpeorujo (g/Kg suelo)	Número de propágulos MA/ 10 g suelo		
		Tratamiento		
		SNE	Mos	Deses
Lechuga	0	11,2a	25,3a	38,2a
	2,5	12,4a	21,2a	35,2a
	5	10,5a	27,5a	37,5a
	10	21,3b	32,2ab	52,6b
	20	22,2b	36,1b	67,2c
Soja	0	12,1a	28,2a	40,5a
	2,5	13,1a	22,2a	45,2a
	5	20,5b	30,3b	50,1ab
	10	25,2bc	30,4b	68,4b
	20	30,3c	37,2c	70,6c
Tomate	0	14,3a	32,1a	53,5a
	2,5	14,7a	37,2ab	58,4a
	5	21,3ab	41,3b	62,4ab
	10	26,4b	42,9b	71,9b
	20	33,3c	43,2b	83,5c

Cada valor es la media de tres repeticiones. Los valores de cada columna seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

Discusión

La aplicación de 20 g de alpeorujos por Kg de suelo produjo un descenso del peso seco de plantas de lechuga, soja y tomate. Dosis de 10 g/Kg de alpeorujos añadido al suelo disminuyeron el peso de plantas de lechuga y soja no inoculadas con el hongo micorrízico, sin embargo, en plantas de tomate, esta disminución se produjo tras la aplicación de 2,5 g/Kg de alpeorujos. Cuando se aplicaron 2,5 g/Kg de alpeorujos a plantas micorrizadas de lechuga y soja disminuyó el peso seco de estas. Estos resultados indican que el alpeorujos tiene sustancias fitotóxicas y sugiere que los hongos MA pueden facilitar la acción o transferencia de sustancias tóxicas a las plantas. En algunos casos, se ha observado un incremento de la sensibilidad de las plantas causado por hongos MA a sustancias tóxicas como algunos metales pesados y herbicidas (Leyval *et al.*, 1997; Nelson y Khan, 1990). Sin embargo, los hongos MA pueden tener diferentes respuestas respecto a compuestos fenólicos (Douds *et al.*, 1996). Las plantas de lechuga y tomate fueron más sensibles que las de soja a la acción del alpeorujos cuando se inocularon con la micorriza endógena del suelo mientras que cuando se inocularon con los endofitos *G. mosseae* o *G. deserticola* fueron las plantas de lechuga y soja las que mostraron menor sensibilidad al alpeorujos que plantas de tomate.

Para dosis de alpeorujos hasta 10 g/Kg, el peso seco de plantas de lechuga y soja inoculadas con *G. mosseae* o *G. deserticola* en el momento de la inoculación de alpeorujos, fue mayor que el de plantas control no inoculadas con el hongo MA. Cuando la dosis de alpeorujos se incrementó hasta 20 g/Kg el peso de plantas de lechuga y soja inoculadas con *G. mosseae* o con *G. deserticola*, disminuyó drásticamente en relación a plantas no inoculadas. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que los hongos MA incrementan la sensibilidad de plantas a la fitotoxicidad originada por la aplicación de alpeorujos. Sin embargo, el peso de plantas inoculadas con *G. mosseae* o con *G. deserticola* cuatro semanas antes de la adición de alpeorujos fue mayor que el de los controles no inoculados para todas las dosis de alpeorujos usadas. Como se ha podido observar con otras sustancias tóxicas, el mejor desarrollo de plantas inoculadas con MA antes de la aplicación de alpeorujos podría explicar su resistencia a la acción fitotóxica de dicho residuo (Ocampo, 1993). Las plantas de tomate mostraron una gran sensibilidad a dosis de alpeorujos bajas con lo que el efecto incrementado de las micorrizas patente en plantas de lechuga y soja no fue posible detectarlo en esta planta.

Los compuestos fenólicos en el suelo pueden tener efectos tóxicos en el crecimiento de plantas a concentraciones a partir de 50 mg/Kg (Wang *et al.*, 1967; Fiestas Ros de Ursinos, 1986). El alpeorujo tiene 6 mg/g de compuestos fenólicos solubles por lo tanto se ha planteado la posibilidad de que los fenoles presentes en dicho residuo sea uno de los factores determinantes de su fitotoxicidad.

Se ha observado una reducción del crecimiento de plantas micorrizadas por la aplicación al suelo de algunos fenoles (Wacker *et al.*, 1990). Nuestros resultados muestran que la aplicación de 2,5 g/Kg de alpeorujo (contenido fenólico de 15 mg/Kg) disminuyó el peso de plantas inoculadas con el hongo MA mientras que fue necesaria la adición de 10 g/Kg de alpeorujo (contenido fenólico 60 mg/Kg) para disminuir el peso de plantas no inoculadas. El crecimiento de la planta puede depender en gran medida de la concentración y la frecuencia de aplicación de sustratos que tienen compuestos fenólicos (Fries *et al.*, 1997).

El establecimiento de la simbiosis MA también parece depender en gran medida de la concentración de compuestos fenólicos presentes en el suelo (Leadir *et al.*, 1997). De acuerdo a nuestros resultados, 2,5 g/Kg de alpeorujo fueron suficientes para disminuir el porcentaje de micorrización de plantas crecidas en suelo no estéril colonizadas por los hongos MA indígenas, sin embargo, cuando se inocularon los endositos *G. mosseae* o *G. deserticola* al mismo tiempo que se aplicó alpeorujo, la longitud de raíz colonizada solo disminuyó cuando se aumentó hasta 10 g/Kg la dosis de alpeorujo aplicada. No obstante, no se observó ningún efecto del alpeorujo en plantas inoculadas con los hongos *G. mosseae* o *G. deserticola* cuatro semanas antes de la adición de alpeorujo. Como sucede con otros contaminantes del suelo, el efecto del alpeorujo en el porcentaje de micorrización parece ser que varía según el tipo de hongo utilizado y el tiempo de inoculación de éste. Se ha descrito que el efecto de factores bióticos y abióticos en la simbiosis MA ocurre cuando el hongo se encuentra en su fase de desarrollo fuera de la raíz (Ocampo, 1993; Leyval *et al.*, 1997). El alpeorujo puede afectar al hongo, cuando el hongo vive por él mismo fuera de la raíz mientras que cuando coloniza la raíz y se alimenta de la planta no se ve afectado por las toxinas. Sin embargo, se observó que el alpeorujo no ejerció ningún efecto en el número de propágulos del hongo MA en el suelo, determinado mediante el método NMP. Por otra parte, la ausencia de efecto de dicho residuo en la actividad metabólica del micelio MA en la raíz, determinada como actividad SDH, sugirió que el alpeorujo no afectó directamente al desarrollo del hongo dentro de la raíz sino que actúa a través de la planta. Los hongos arbusculares no sólo son resistentes a la acción de alpeorujo sino que además incrementa la sensibilidad de plantas micorrizadas a la fitotoxicidad de dicho residuo. El mecanismo por el que el hongo arbuscular incrementa la

Capítulo II

susceptibilidad de la planta al alpeorajo no se conoce aunque se especula que las micorrizas pueden incrementar la absorción de fenoles y otras sustancias fitotóxicas.

Capítulo III

Transformación del alpeorujo por hongos saprobios

3. Transformación del alpeorajo por hongos saprobios

3.1. Estudio de la reducción de la fitotoxicidad del alpeorajo mediante el empleo de hongos saprobios productores de enzimas hidrolíticas

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primero, el factor alpeorajo incubado o no con los hongos saprobios: *W. inflatus*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum*, *Pe. chrysogenum*, *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum* 3, *F. oxysporum* 738, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. El segundo factor consistió en los distintos tiempos de incubación del alpeorajo con los hongos saprobios: 0, 2, 5, 10, 15 y 20 semanas. Se utilizaron como controles, plantas cultivadas en ausencia de alpeorajo inoculadas o no con cada hongo saprobio de estudio. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Las plantas de soja y tomate se cultivaron en macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla de suelo:arena esterilizado, a las que se reinoculó con un filtrado de suelo. Se cultivó una plántula por maceta. El alpeorajo seco y extractado incubado con los distintos hongos saprobios durante 0, 2, 5, 10, 15 y 20 semanas previamente esterilizado, se añadió a las diferentes plantas a concentraciones de 0 y 60 g/kg.

Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en el invernadero y semanalmente se aplicó 10 ml de la solución de Long Asthon con 0,5 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Determinaciones

Las plantas se cultivaron en invernadero durante 30 días, determinándose después de la cosecha los parámetros siguientes: peso seco de parte aérea y de raíz y el contenido de N, P y K en sus tejidos (Mingorance, 2002).

Resultados

Los resultados del estudio muestran que la adición de alpeorujos seco y extractado sin incubar con hongos saprobios en una proporción de 60 g/Kg produjo una disminución del peso seco de la parte aérea y raíz de plantas de soja (Fig. 1, 2, 3 y 4). La inoculación del alpeorujos con determinados hongos saprobios aportó beneficios sobre el peso seco de la parte aérea en relación a su control con alpeorujos sin inocular. La inoculación del alpeorujos seco y extractado con los hongos saprobios *T. koningii* y *Pa. farinosus* no aumentó el peso seco de la parte aérea de plantas de soja, sin embargo, la inoculación del alpeorujos con los hongos saprobios *W. inflatus*, *T. harzianum*, *Pe. brevicompactum*, *Pe. chrysogenum*, *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum* 3, *F. oxysporum* 738, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium* disminuyó el efecto fitotóxico del alpeorujos seco y extractado de distinta manera según los distintos tiempos de inoculación (Fig. 1 y 2). Así *W. inflatus*, *F. oxysporum* 738, *F. concolor* y *F. lateritium* aumentaron el peso seco de parte aérea de plantas de soja después de 5 semanas de incubación, mientras que *T. harzianum*, *Pe. brevicompactum*, *Pe. chrysogenum*, *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum* 3 y *F. graminearum* necesitaron 10 semanas de incubación para aumentar el peso seco de la parte aérea de plantas de soja. El efecto fitotóxico del alpeorujos sobre el peso seco de plantas de soja también se redujo con la inoculación de este con los hongos saprobios *W. inflatus*, *T. harzianum*, *Pe. brevicompactum*, *Pe. chrysogenum* (Fig. 3), *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum* 3, *F. oxysporum* 738, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium* (Fig. 4). Como indican las Figuras 3 y 4, el efecto fitotóxico del alpeorujos sobre el peso seco de la raíz de plantas de soja también se redujo tras la incubación durante 5 semanas con los hongos saprobios, *W. inflatus*, *T. harzianum*, *Pe. chrysogenum*, *F. oxysporum* 3, *F. oxysporum* 738, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium* y tras la incubación durante 10 semanas con *Pe. brevicompactum* y *Pl. ostreatus*. La incubación de alpeorujos con *T. koningii* y *Pa. farinosus* no produjo un aumento en el peso seco de la raíz de plantas de soja (Fig. 3 y 4). No hubo diferencias significativas entre el peso seco tanto de parte aérea como de raíz entre las plantas de soja no inoculadas e inoculadas con una suspensión estéril de los distintos hongos saprobios en ausencia de alpeorujos (Fig. 1, 2, 3 y 4).

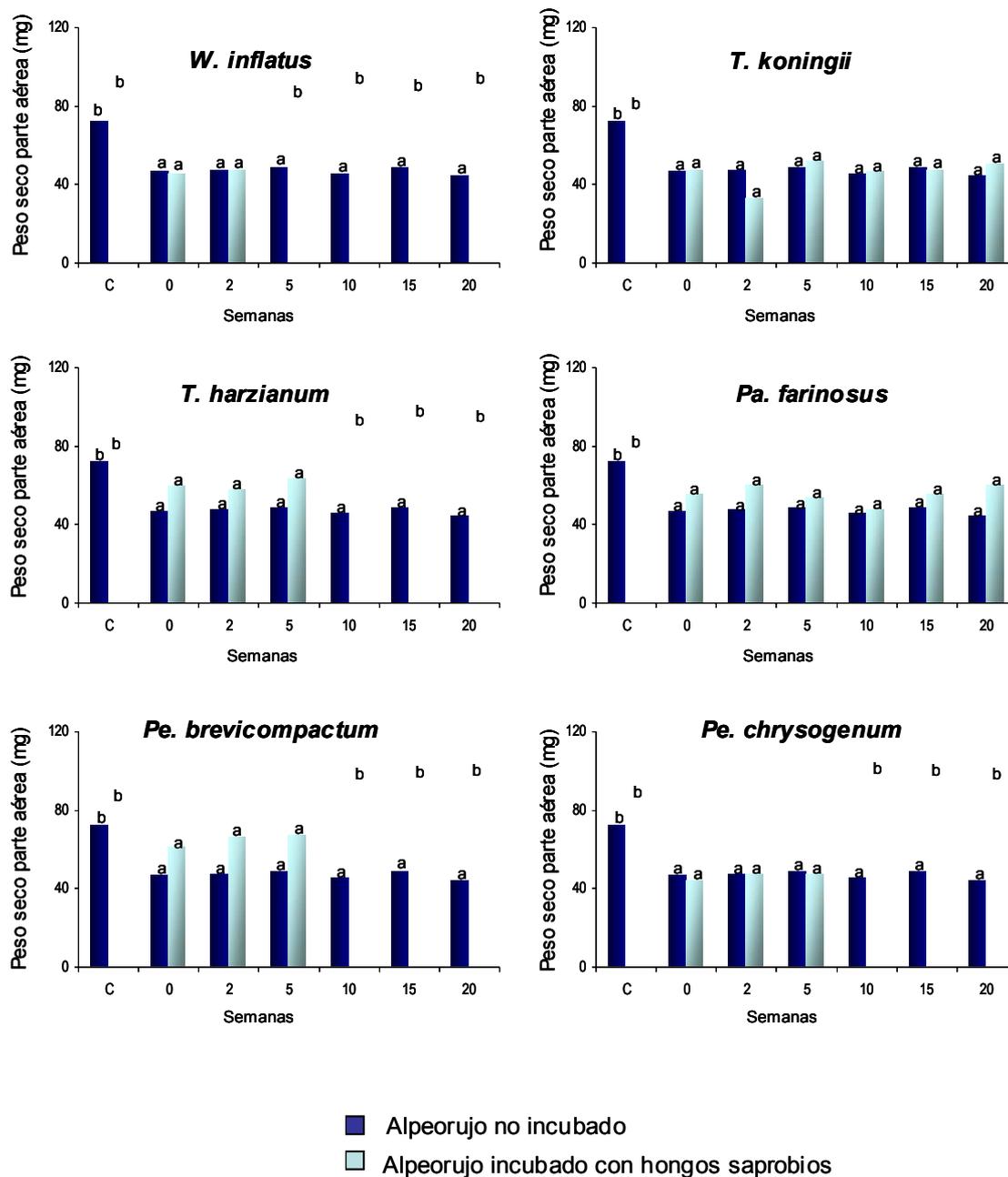


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea de plantas de soja (*Glycine max* L.) crecidas sin alpeorujos (C) y en presencia de alpeorujos seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *W. inflatus*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum* y *Pe. chrysogenum*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

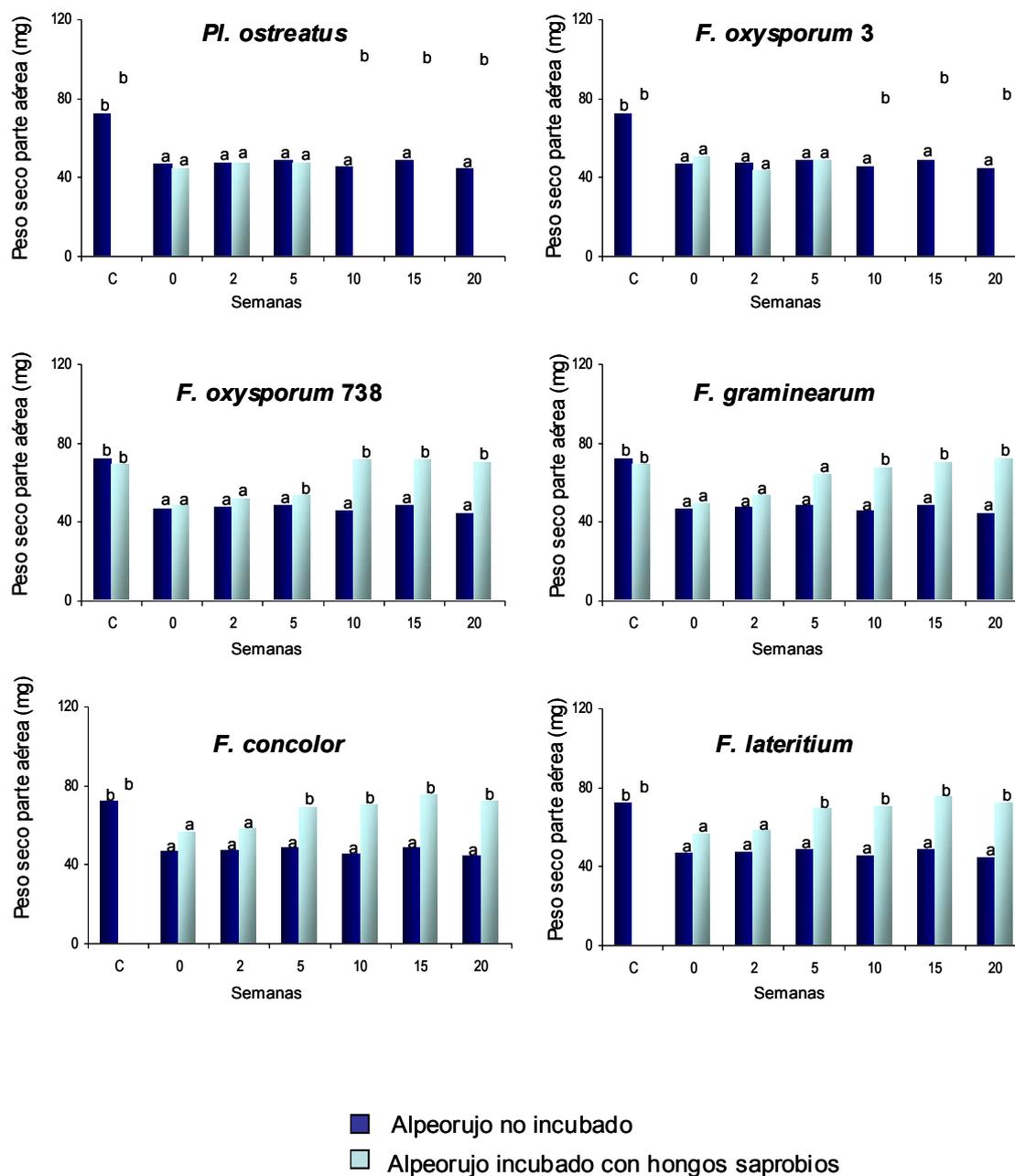


Fig. 2. Peso seco de la parte aérea de plantas de soja (*Glycine max* L.) crecidas sin alpeorujos (C) y en presencia de alpeorujos secos y extractados (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum 3*, *F. oxysporum 738*, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

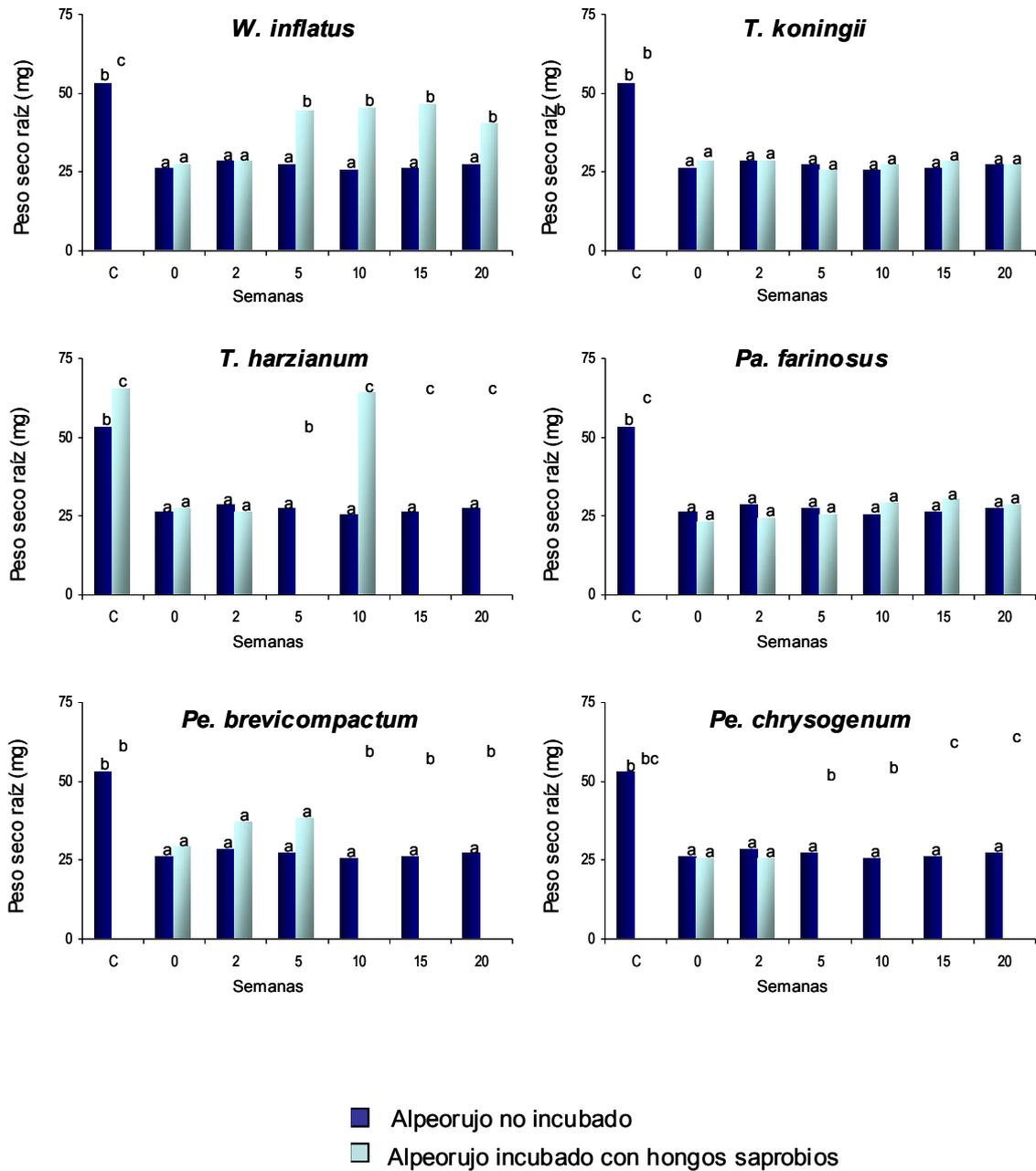


Fig. 3. Peso seco de la raíz de plantas de soja (*Glycine max* L.) crecidas sin alpeorujó (C) y en presencia de alpeorujó seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *W. inflatus*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum* y *Pe. chrysogenum*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

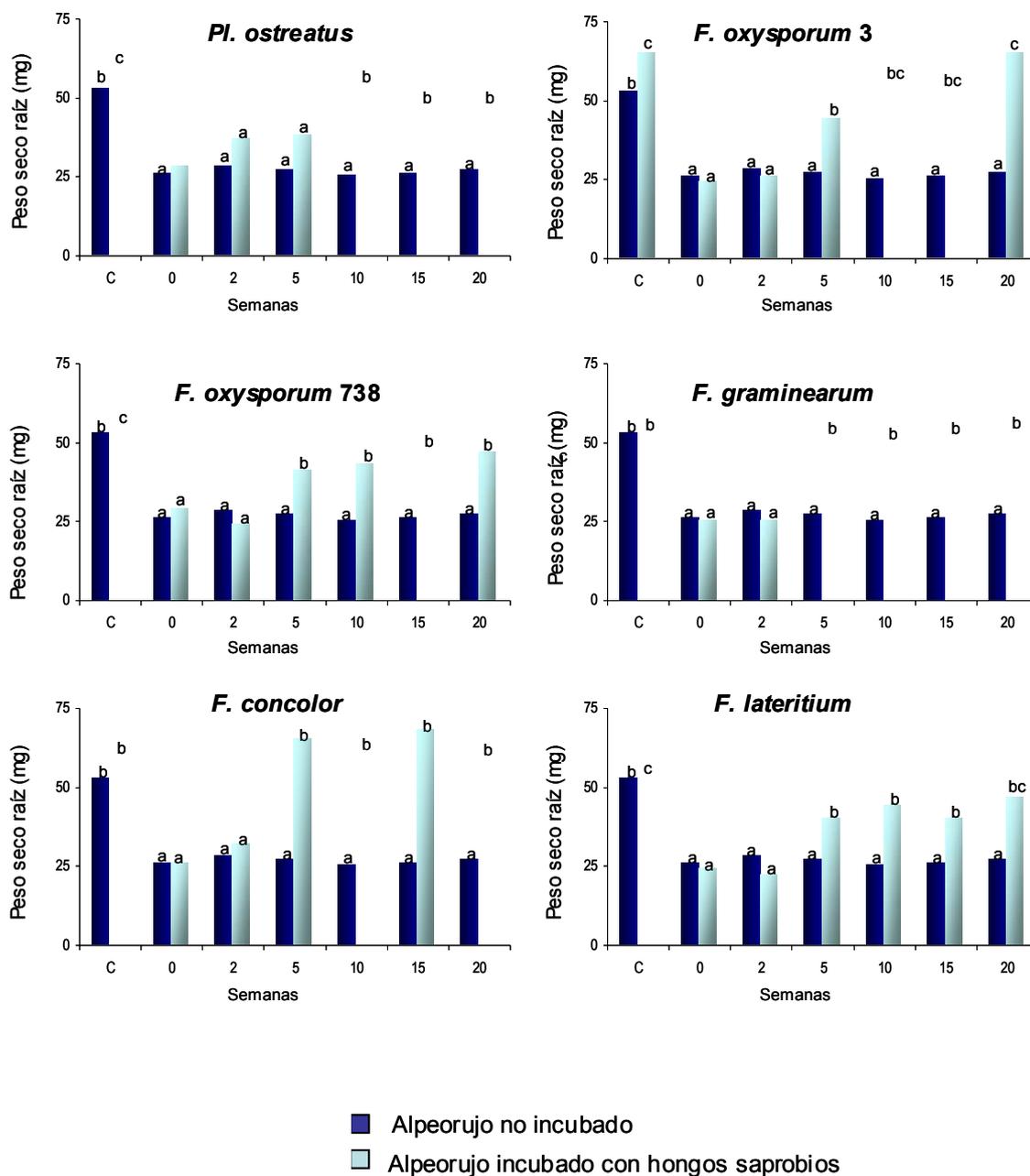


Fig. 4. Peso seco de la raíz de plantas de soja (*Glycine max* L.) crecidas sin alpeorujó (C) y en presencia de alpeorujó seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum 3*, *F. oxysporum 738*, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

El peso seco de parte aérea y de raíz de plantas de tomate al igual que ocurrió en plantas de soja, decreció tras la adición al suelo de 60 g/Kg de alpeorujos seco y extractado (Fig. 5, 6, 7 y 8). La inoculación del alpeorujos con distintos hongos saprobios descendió el efecto fitotóxico del alpeorujos sobre el peso seco de parte aérea y raíz de tomate y la reducción de dicha fitotoxicidad fue paralela al tiempo de inoculación de los hongos saprobios. La inoculación del alpeorujos seco y extractado con los hongos saprobios *Pe. chrysogenum* y *F. oxysporum* 3 no modificó el efecto fitotóxico del alpeorujos referido al peso seco de la parte aérea de plantas de tomate, sin embargo, la inoculación con el resto de hongos saprobios disminuyó el efecto fitotóxico del alpeorujos seco y extractado de distinta manera según los distintos tiempos de inoculación (Fig. 5 y 6). Así la incubación con *T. koningii* y *Pl. ostreatus* aumentaron el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate después de 2 semanas de incubación, *T. harzianum* y *F. graminearum* necesitaron 5 semanas de incubación, mientras que *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum*, *F. oxysporum* 738, *F. concolor* y *F. lateritium* aumentaron el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate después de 10 semanas de incubación. *W. inflatus* necesitó 15 semanas de incubación para reducir el efecto fitotóxico de alpeorujos sobre el peso seco de parte aérea de tomate (Fig. 5 y 6). No se observaron diferencias significativas entre el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate cultivadas en ausencia de alpeorujos y plantas cultivadas en presencia de alpeorujos incubado durante 20 semanas con *T. harzianum*, *Pe. brevicompactum*, *Pl. ostreatus* y *F. graminearum*. La adición de alpeorujos seco y extractado incubado con *F. oxysporum* 738 y *F. lateritium* durante 20 semanas incrementó el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en comparación con el de plantas cultivadas en ausencia de alpeorujos (Fig. 6). El efecto fitotóxico de alpeorujos sobre el peso seco de raíz de tomate también se redujo por la inoculación de los distintos hongos saprobios ensayados después de diferentes períodos de incubación. Como muestran las Figuras 7 y 8 el efecto fitotóxico del alpeorujos sobre el peso seco de la raíz de tomate se redujo cuando el alpeorujos se incubó durante 5 semanas con *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pe. chrysogenum*, *Pl. ostreatus* y *F. graminearum* mientras que los hongos *Pa. farinosus*, *F. oxysporum* 738, *F. concolor* y *F. lateritium* necesitaron 10 semanas de incubación para descender la fitotoxicidad (Fig. 7 y 8). La incubación del alpeorujos con *W. inflatus*, *Pe. brevicompactum* y *F. oxysporum* 3 no aumentó el peso seco de raíz de tomate. No hubo diferencias tanto en el peso seco de parte aérea y raíz de tomate inoculado o no con una suspensión de los hongos ensayados en ausencia de alpeorujos (Fig. 5, 6, 7 y 8).

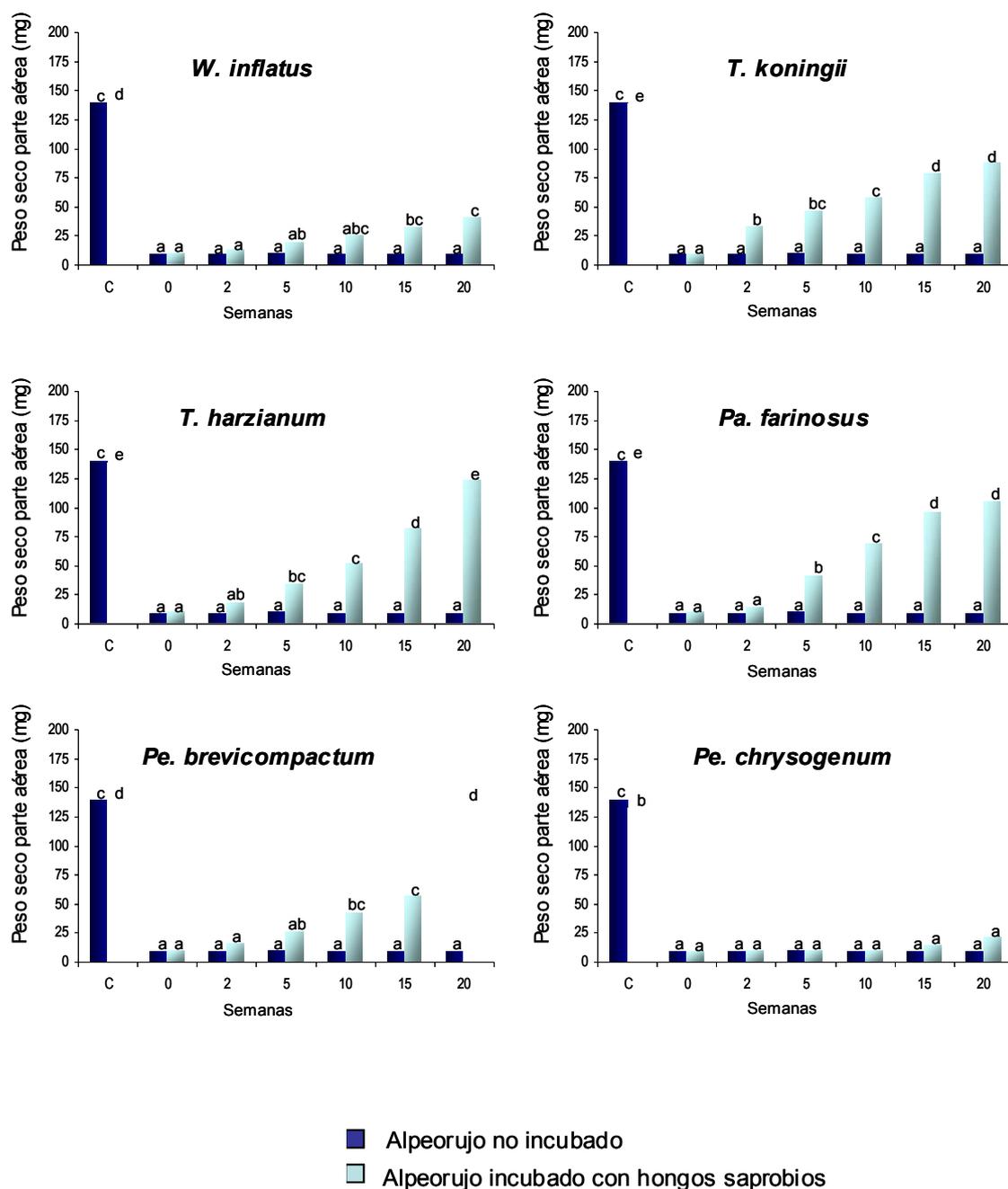


Fig. 5. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas sin alpeorujno (C) y en presencia de alpeorujno seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *W. inflatus*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum* y *Pe. chrysogenum*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

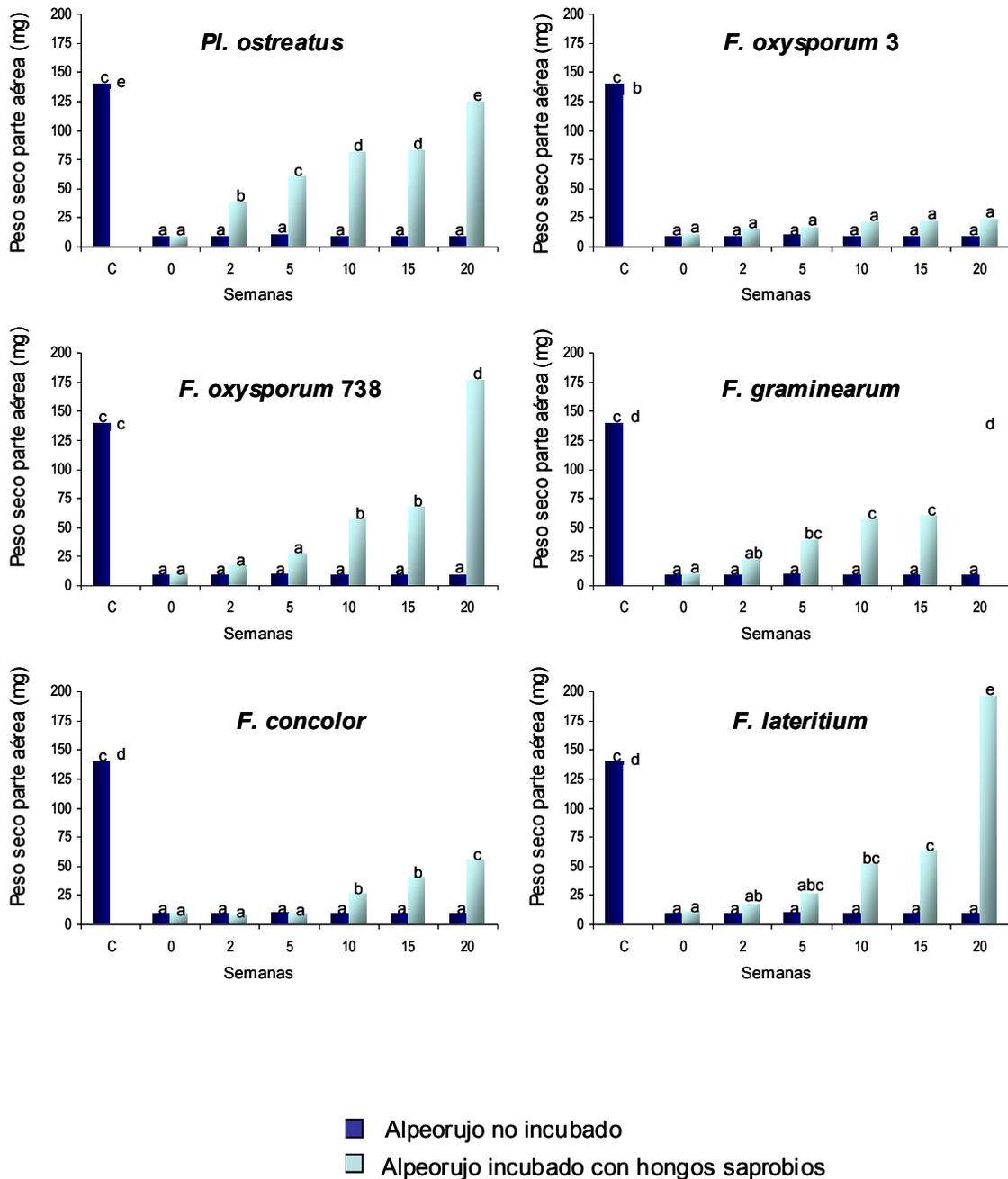


Fig. 6. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) crecidas sin alpeorujó (C) y en presencia de alpeorujó seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum 3*, *F. oxysporum 738*, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

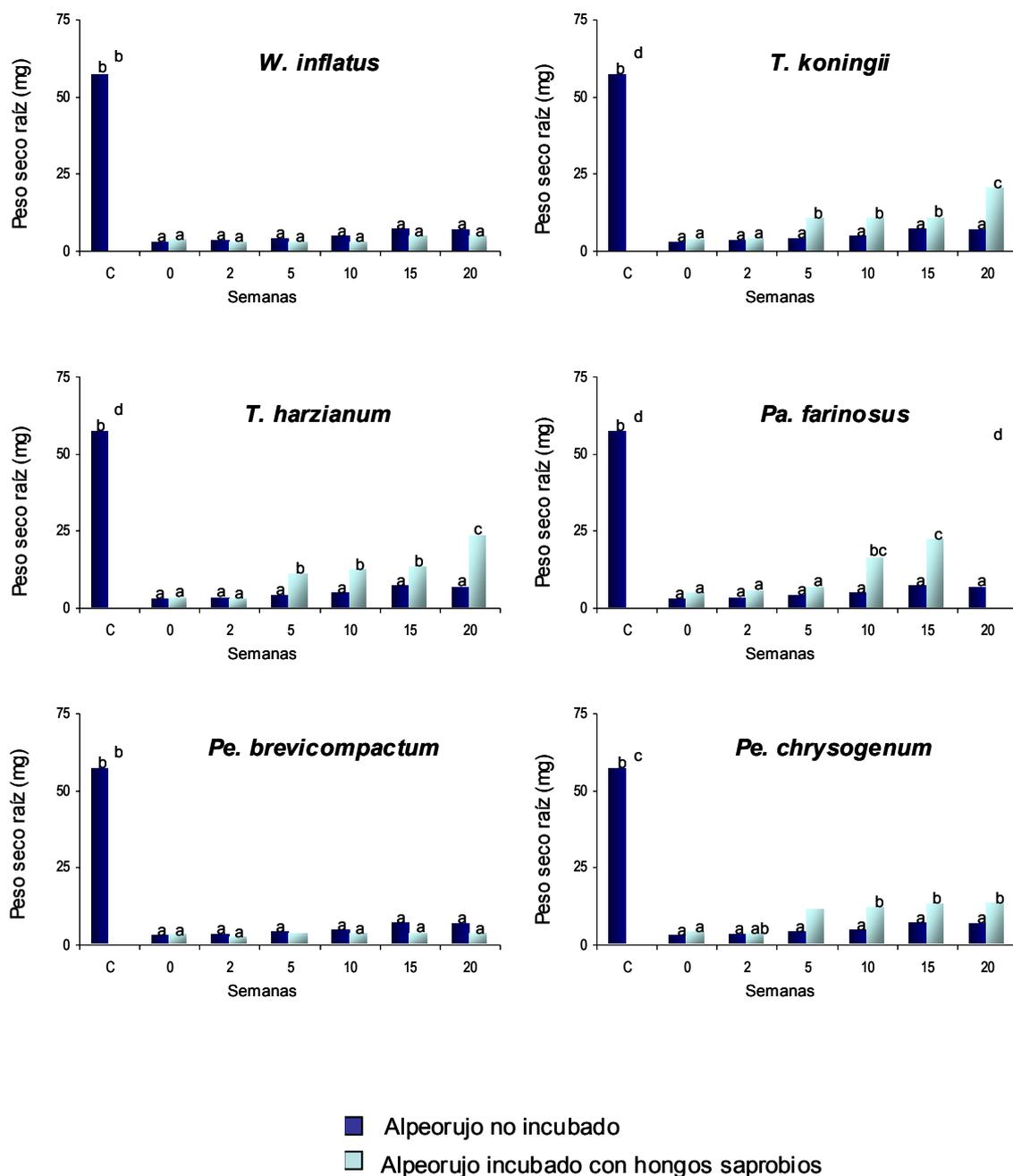


Fig. 7. Peso seco de la raíz de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas sin alpeorujos (C) y en presencia de alpeorujos seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *W. inflatus*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum* y *Pe. chrysogenum*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

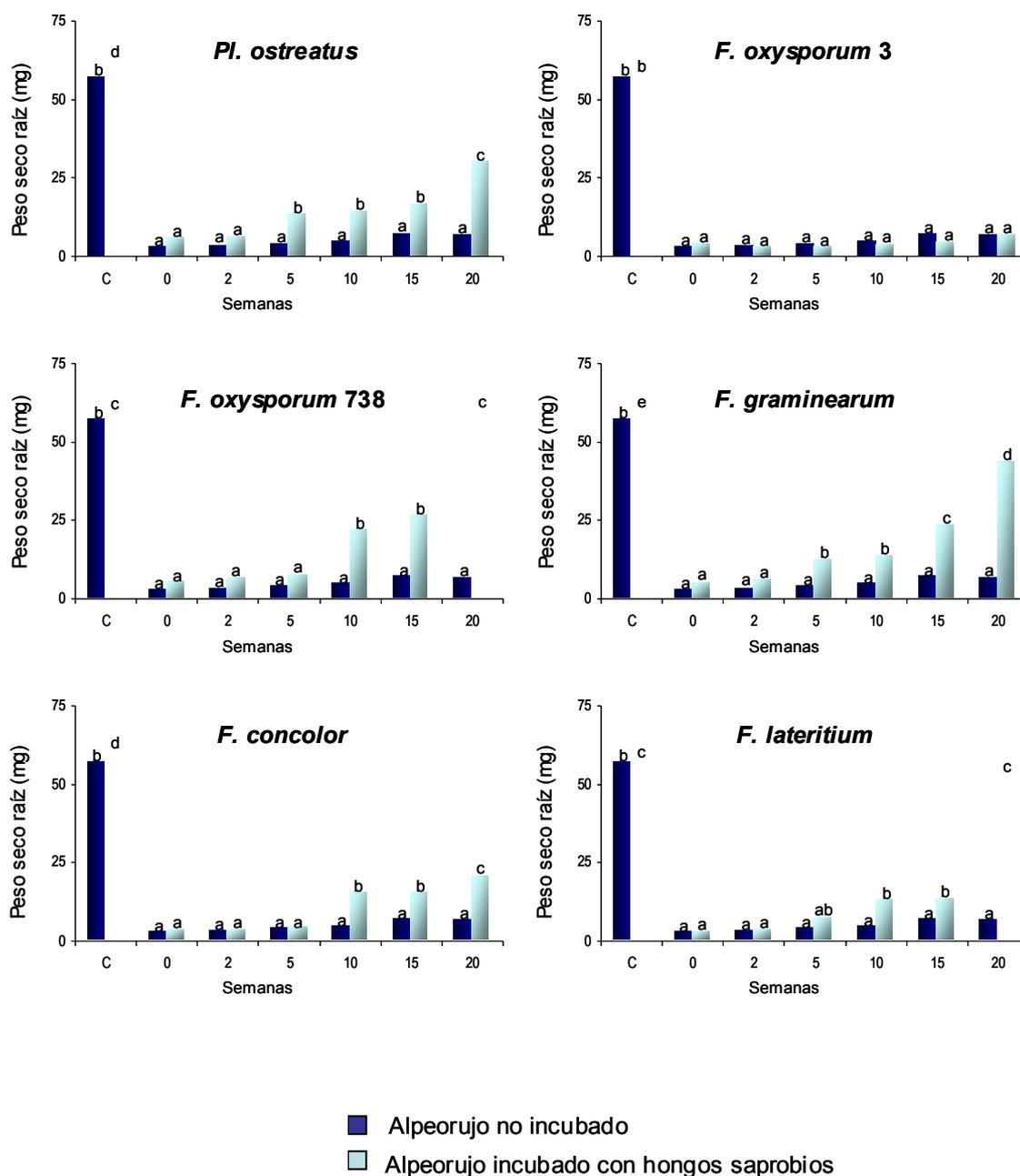


Fig. 8. Peso seco de la raíz de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas sin alpeorujó (C) y en presencia de alpeorujó seco y extractado (60 g/Kg) incubado o no a diferentes tiempos con los hongos *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum 3*, *F. oxysporum 738*, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

El contenido total de fenoles del alpeorujó después de la extracción de este con agua fue de 26 g/Kg (Fig. 9). La incubación de alpeorujó durante 20 semanas a 28°C no afectó su contenido fenólico, sin embargo, la inoculación de este con los hongos saprobios utilizados en el ensayo disminuyó el contenido fenólico. El descenso en el contenido fenólico de alpeorujó tras la incubación con los diferentes hongos saprobios utilizados se hizo patente a partir de las 2 semanas de incubación. El aumento del tiempo de incubación del residuo con los hongos saprobios fue paralelo al descenso del contenido fenólico del alpeorujó. Todos los hongos estudiados disminuyeron el contenido fenólico aunque la efectividad fue diferente según el tipo de hongo.

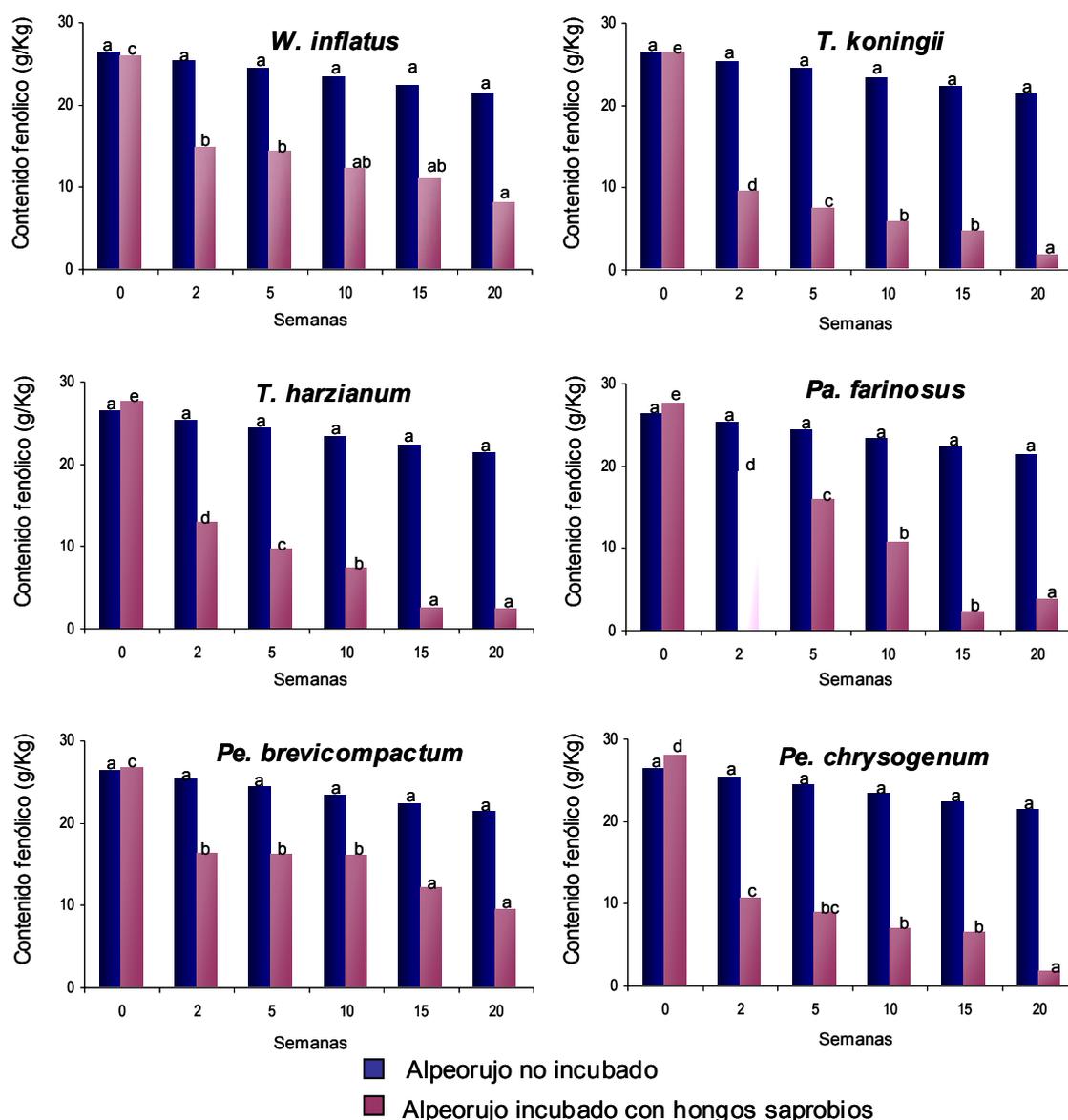


Fig. 9. Contenido fenólico de alpeorujó incubado o no durante diferentes tiempos con los hongos *W. inflatus*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Pa. farinosus*, *Pe. brevicompactum* y *Pe. chrysogenum*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

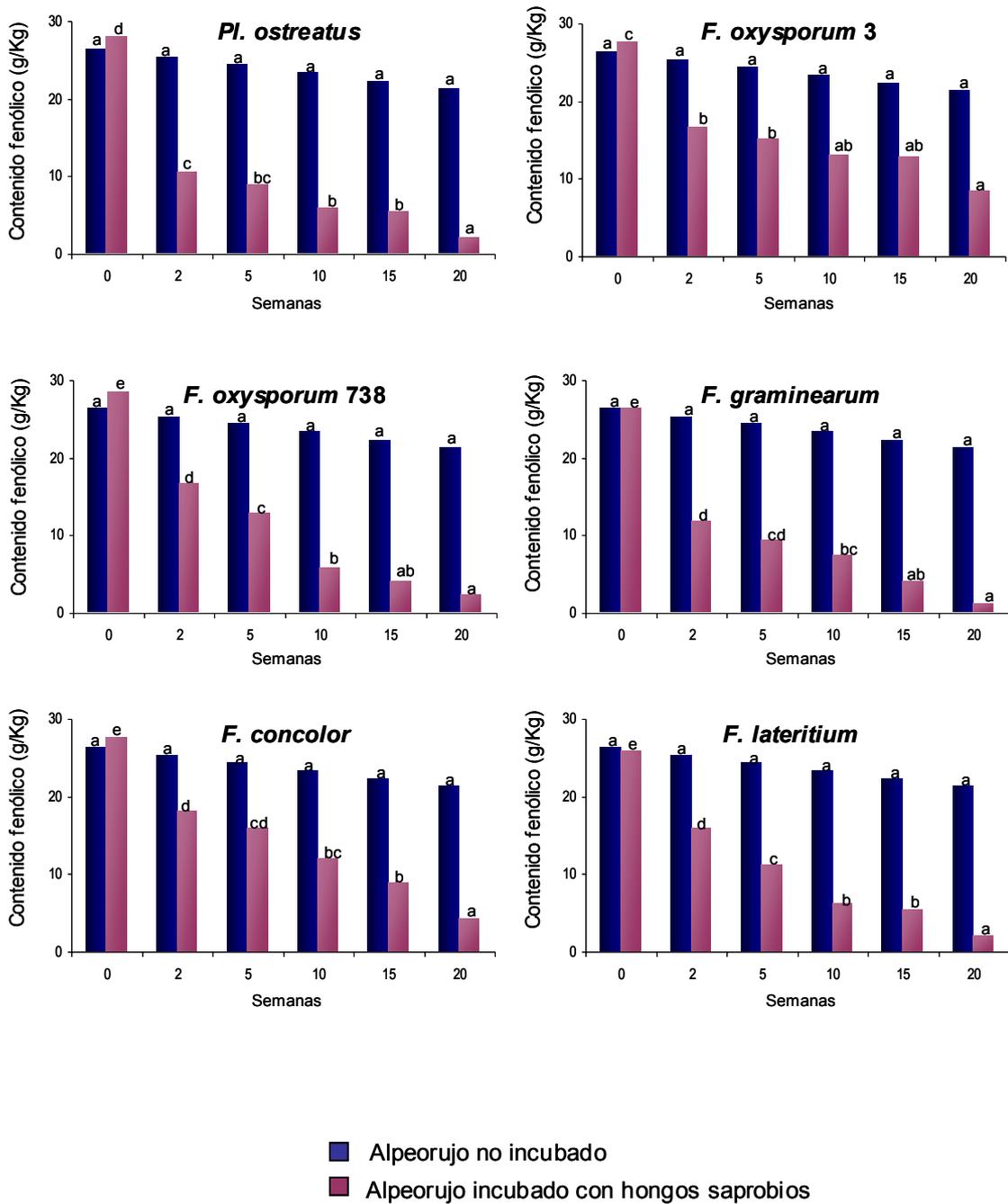


Fig. 10. Contenido fenólico de alpeorju incubado o no durante diferentes tiempos con con los hongos *Pl. ostreatus*, *F. oxysporum 3*, *F. oxysporum 738*, *F. graminearum*, *F. concolor* y *F. lateritium*. Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

Se observó una correlación entre el contenido fenólico del alpeorujo seco y extractado inoculado con los hongos saprobios y el peso seco de la parte aérea de las plantas de soja ($r = 0,75$; $P = 0,0001$) y de tomate ($r = 0,73$; $P = 0,0005$) (Fig. 5). Una menor correlación fue patente entre el contenido fenólico del alpeorujo seco y extractado inoculado con los hongos saprobios y el peso seco de la raíz de las plantas de soja ($r = 0,51$; $P = 0,001$) y de tomate ($r = 0,56$; $P = 0,0001$).

3.2. Estudio de la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujo mediante el empleo de hongos saprobios productores de enzimas ligninolíticas

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primero, el factor inoculación del alpeorujo con hongos saprobios, que contenía once tratamientos: plantas sin alpeorujo (C), con alpeorujo no inoculado (O) y plantas con alpeorujo incubado con los hongos saprobios *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chryso sporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*. La segunda variable consistió en el tiempo de incubación con los hongos saprobios: 2 y 20 semanas. Estos experimentos se realizaron en plantas de tomate con cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Las plantas de tomate se cultivaron en macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla de suelo:arena esterilizado, a las que se reinoculó con un filtrado de suelo. Se cultivó una plántula por maceta. El alpeorujo seco y extractado incubado con los distintos hongos saprobios durante 2 y 20 semanas previamente esterilizado, se añadió a las diferentes plantas a concentraciones de 0 y 60 g/kg.

Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en el invernadero y semanalmente se aplicó 10 ml de la solución de Long Asthon con 0,5 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Determinaciones

Las plantas se cultivaron en invernadero durante 30 días, determinándose después de la cosecha el peso seco de la parte aérea y de raíz tras secar las plantas a 70°C durante 48 h.

Por otro lado se determinó el contenido fenólico del alpeorujillo seco y extractado incubado con los diferentes hongos saprobios durante 2 y 20 semanas.

Resultados

El peso seco de parte aérea y de raíz de plantas de tomate decreció tras la adición al suelo de 60 g/Kg de alpeorujillo seco y extractado (Fig. 1). La fitotoxicidad del alpeorujillo no se vio prácticamente afectada por la incubación con hongos saprobios durante 2 semanas. La incubación del alpeorujillo durante 20 semanas con distintos hongos saprobios descendió el efecto fitotóxico del alpeorujillo sobre el peso seco de parte aérea y raíz de tomate de forma diferente. Así, la inoculación del alpeorujillo seco y extractado con los hongos saprobios *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius* no modificó el efecto fitotóxico del alpeorujillo referido al peso seco de la parte aérea de plantas de tomate, sin embargo, la inoculación con los hongos saprobios *C. rigida*, *Ph. radiata* y *Po. subvermisporea* disminuyó el efecto fitotóxico del alpeorujillo seco y extractado. La adición de alpeorujillo seco y extractado incubado con *Ph. radiata* y *Po. subvermisporea* durante 20 semanas incrementó el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en comparación con el de plantas cultivadas en ausencia de alpeorujillo.

El efecto fitotóxico de alpeorujillo sobre el peso seco de raíz de tomate también se redujo por la inoculación de los distintos hongos saprobios ensayados después de 20 semanas de incubación. Como muestrales Figuras 1 el efecto fitotóxico del alpeorujillo sobre el peso seco de la raíz de tomate se redujo cuando el alpeorujillo se incubó durante 20 semanas con *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermisporea* y *Py. cinnabarinus*. La adición de alpeorujillo seco y extractado incubado con *Ph. radiata* durante 20 semanas incrementó el peso seco de la raíz de plantas de tomate en comparación con el de plantas cultivadas en ausencia de alpeorujillo.

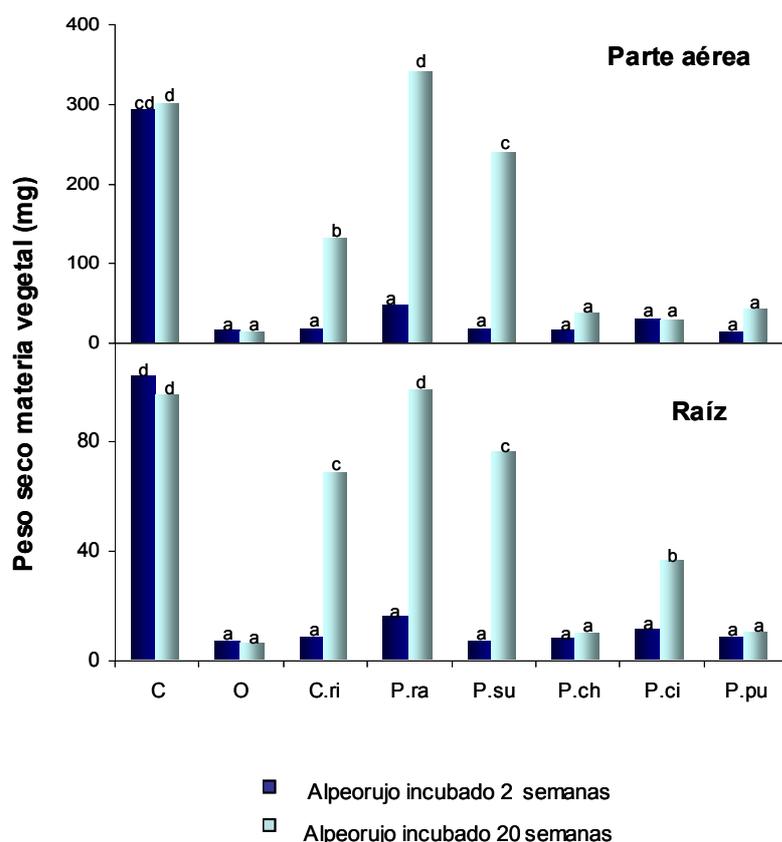


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea y raíz de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) crecidas sin alpeorujos (C), con alpeorujos seco y extractado no incubado (O) y en presencia de alpeorujos seco y extractado (60 g/Kg) incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispura* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas (Duncan's. P=0.05).

El contenido fenólico de alpeorujos seco y extractado incubado con los diferentes hongos varió dependiendo del tipo de hongo saprobio y del tiempo de incubación de éste. Así, cuando el alpeorujos se incubó durante 2 semanas con los hongos, no se observó una modificación del contenido fenólico con respecto al obtenido en alpeorujos sin inocular o alpeorujos control, excepto en el caso del hongo *C. rigida* en el que se detectó un leve descenso del contenido fenólico (Fig. 2).

La incubación durante 20 semanas del alpeorujos disminuyó el contenido fenólico de este respecto al alpeorujos sin incubar, con todos los hongos saprobios excepto en el caso de *Pha. chrysosporium*. El mayor descenso en el contenido fenólico se produjo

con la incubación del alpeorujo con los hongos *C. rigida*, *Ph. radiata* y *Py. cinnabarinus* (Fig. 2).

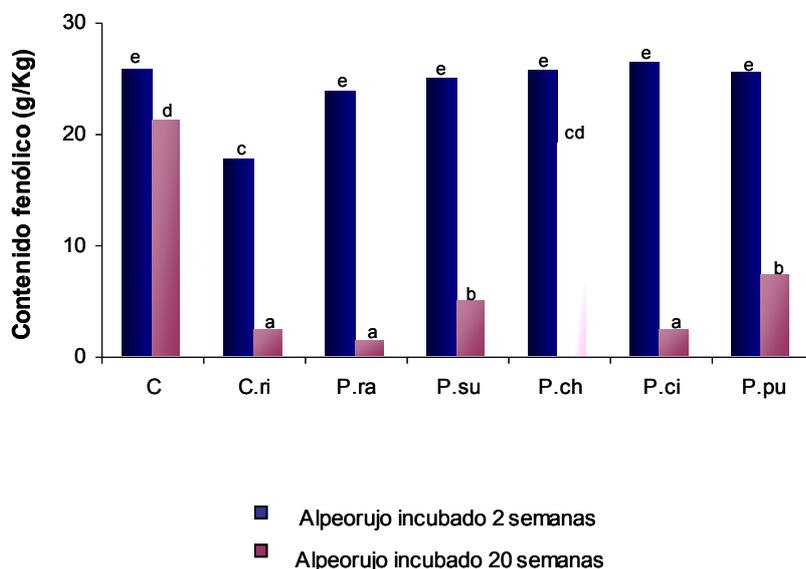


Fig. 2. Contenido fenólico de alpeorujo tras su incubación durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas entre los tratamientos (Duncan's. P=0.05)

3.3. Cambios en la composición química del alpeorujo durante el proceso de transformación por hongos saprobios

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primero, el factor alpeorujo incubado con los hongos saprobios, contenía 10 tratamientos: alpeorujo control (C), alpeorujo inoculado con hongos saprobios de suelo: *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum* y *Paecilomyces farinosus* y hongos saprobios de madera: *Corioloipsis rígida*, *Phlebia radiata*, *Poria subvermispora*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pl. pulmonaris*. El segundo factor consistió en los distintos

tiempos de incubación del alpeorujó con los hongos saprobios: 0 y 20 semanas. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Determinaciones

A todos los tratamientos se realizaron las siguientes determinaciones según la metodología descrita anteriormente.

3.3.1. pH

3.3.2. Color

3.3.3. Carbono extraíble total, ácidos húmicos y fúlvicos

3.3.4. Macro y micronutrientes

3.3.5. Lignina, hemicelulosa, celulosa y lignina polimérica precipitable en ácido

3.3.6. Azúcares totales

3.3.7. Contenido fenólico

- Determinación de polifenoles totales
- Fraccionamiento del contenido fenólico
- Análisis de compuestos fenólicos simples
- Determinación de fenoles de extracto metanol-agua de alpeorujó
- Determinación de fenoles de extracto de acetato de etilo de alpeorujó

Resultados

3.3.1. pH

El pH del alpeorujó no incubado con hongos saprobios no varió a lo largo del proceso de incubación. El proceso de incubación del alpeorujó con los hongos saprobios aumentó de forma casi generalizada el pH salvo en el caso de la inoculación

con *C. rígida* y *Pha. chrysosporium* (Tabla 1). El aumento de pH tras la incubación de los hongos dependió del tiempo de incubación y del tipo de hongo. Los hongos más efectivos en este aumento fueron *F. lateritium*, *Ph. radiata*, *Pa. farinosus* y *Po. subvermispora*.

Tabla 1. pH del extracto acuoso de alpeorujo incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	pH 2 semanas	pH 20 semanas
Control	5,33cd	5,15c
<i>F. lateritium</i>	7,09h	9,21l
<i>F. oxysporum</i>	7,68i	7,95i
<i>Pa. farinosus</i>	4,85b	8,88k
<i>C. rígida</i>	5,34cd	5,38cde
<i>Ph. radiata</i>	6,87h	8,47j
<i>Po. subvermispora</i>	5,75f	9,03kl
<i>Pha. chrysosporium</i>	2,60a	4,58b
<i>Py. cinnabarinus</i>	6,54g	5,45de
<i>Pl. pulmonarius</i>	5,64ef	5,93f

Valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

3.3.2. Color

La medida del color se valoró tanto visualmente (Fig. 1) como espectrofotométricamente donde se expresó según la metodología L^* , a^* y b^* , determinados a partir de valores de absorbancia obtenidos (Fig. 2).

En la Fig. 1 se ve claramente una decoloración del alpeorujó tratado con los hongos *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Py. cinnabarinus* y *Pha. chrysosporium*. Con el resto de hongos utilizados no se observa ninguna degradación del color del alpeorujó.

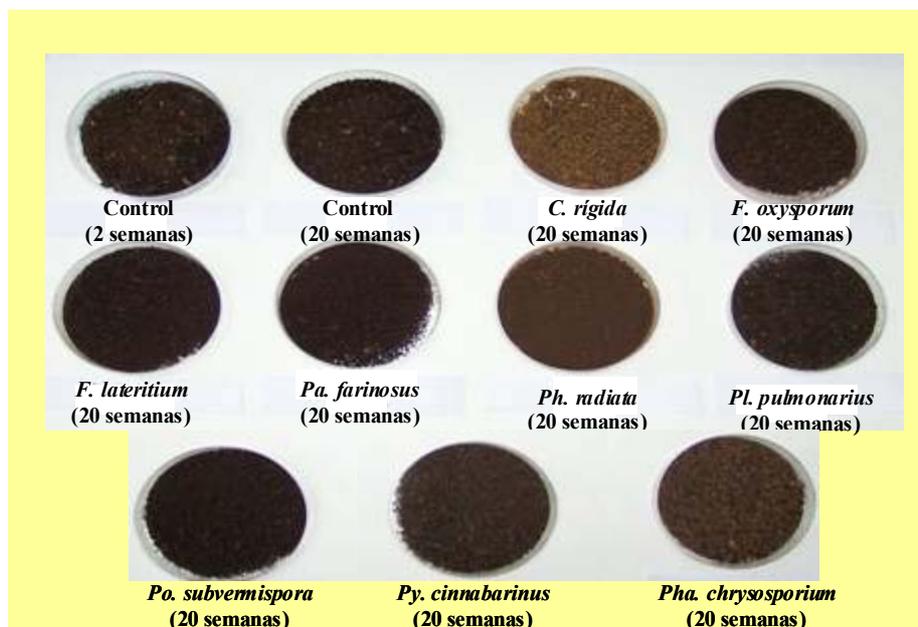


Fig. 1. Color de alpeorujó incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *C. rígida*, *F. oxysporum*, *F. lateritium*, *Pa. farinosus*, *Ph. radiata*, *Pl. pulmonarius*, *Po. subvermispora*, *Py. cinnabarinus* y *Pha. chrysosporium*.

Los tres parámetros (L^* , a^* y b^*) que expresan la diferencia en coloración mostraron valores similares. La mayoría de los hongos estudiados decoloran el alpeorujó, siendo este efecto más pronunciado después de 20 semanas de incubación de este residuo. El mayor incremento en los parámetros de eliminación de color correspondió al alpeorujó tratado con el hongo *C. rígida*, seguido de *Ph. radiata*, *Py. cinnabarinus* y *Pha. chrysosporium* (Fig. 2). Es importante reseñar que estos datos obtenidos mediante métodos espectrofotométricos corroboran los datos obtenidos anteriormente de forma visual.

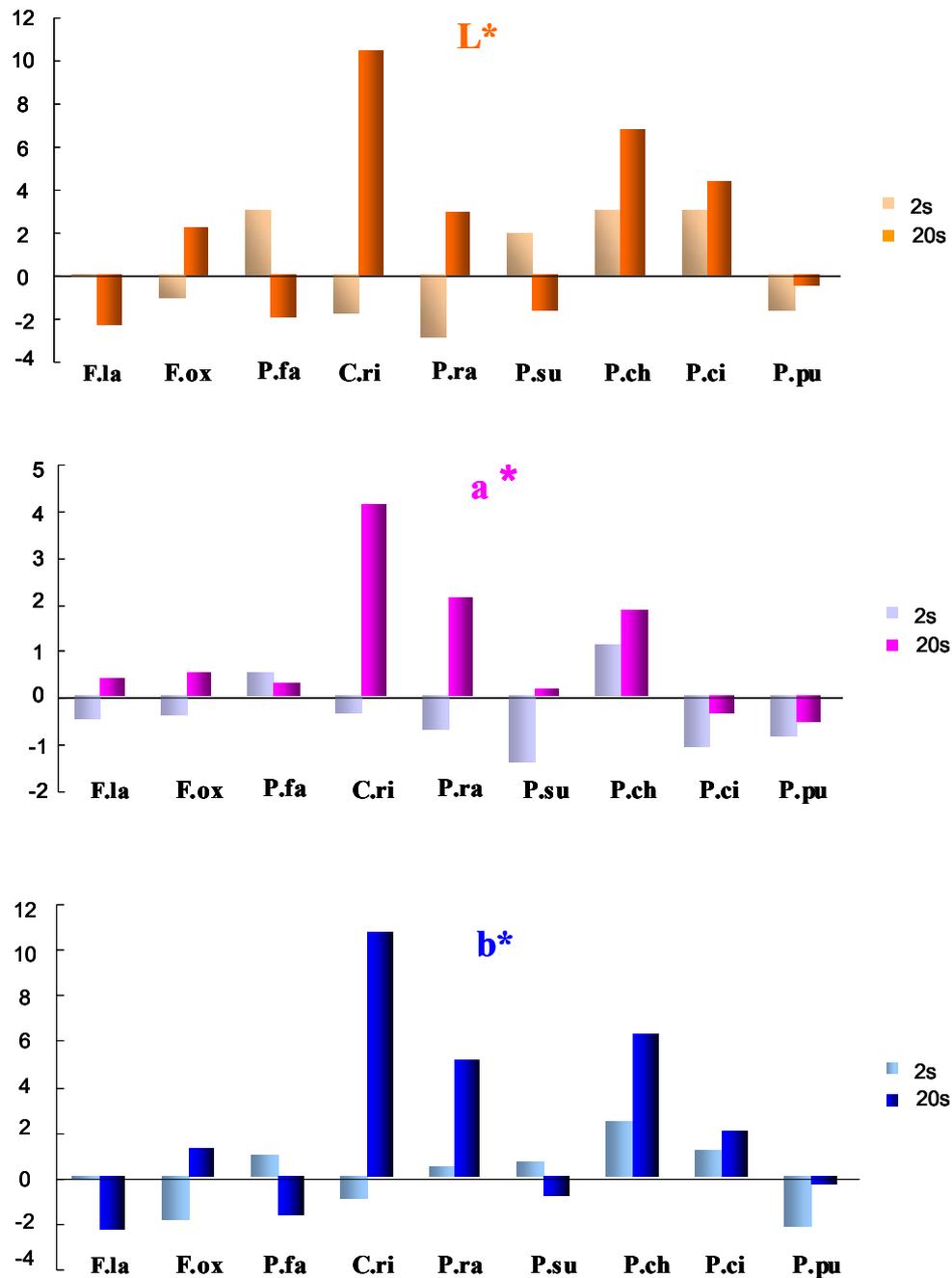


Fig. 2. Diferencias de color (expresado con los parámetros L*,a* y b*) entre alpeorujos no incubados y alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *Pl. pulmonarius* (P.pu), *C. rigida* (C.ri), *Py. cinnabarinus* (P.ci), *F. lateritium* (F.la), *Ph. radiata* (P.ra), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *Po. subvermispora* (P.su) y *Pha. chrysosporium* (P.ch).

3.3.3. Carbono extraíble total, ácidos húmicos y fúlvicos

En la Tabla 2 se observa como el contenido en carbono extraíble con pirofosfato y de ácidos fúlvicos de alpeorujos sin inocular fue mayor al de alpeorujos inoculados con los distintos hongos saprobios. La inoculación de alpeorujos con cualquiera de los hongos saprobios ensayados disminuyó el contenido de CET y ácidos fúlvicos, el porcentaje de disminución varió dependiendo del tipo de hongo utilizado y del tiempo de incubación. Así, la incubación con los hongos *F. oxysporum*, *Pa. farinosus* y *Py. cinnabarinus* aumentó los niveles de carbono extraíble total y ácidos fúlvicos con el tiempo de incubación, sin embargo, los hongos *F. lateritium*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora* y *Pha. chrysosporium* los disminuyeron. El resto de hongos estudiados no modificaron los niveles de carbono extraíble total y ácidos fúlvicos al aumentar el tiempo de incubación.

Los niveles de ácidos húmicos de alpeorujos incubados durante 20 semanas con la mayoría de los hongos aumentaron al final del proceso de incubación (Tabla 2). La incubación con *C. rigida*, *Pha. chrysosporium* y *Pl. pulmonarius*, sin embargo, no modificó los niveles de ácidos húmicos detectados.

Tabla 2. Concentración de carbono extraíble total, ácidos húmicos y fúlvicos (g/Kg) de alpeorajo incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Carbono extraíble total g/Kg		Ácidos húmicos g/Kg		Ácidos fúlvicos g/Kg	
	2s	20s	2s	20s	2s	20s
No inoculado	215,7e	256,5f	29,6de	25,5bcde	186,1e	231f
<i>F. lateritium</i>	163,6abcd	137,8ab	27,6de	40,5f	136bcd	97,3a
<i>F. oxysporum</i>	158,5abcd	177bcde	26,6cde	37,9f	131,9bcd	139,1bcd
<i>Pa. farinosus</i>	163,1abcd	326g	30e	49,1g	133,1bcd	276,9g
<i>C. rígida</i>	173,5bcd	178,2bcde	21,5abc	28de	152bcde	150,2bcde
<i>Ph. radiata</i>	152,7abcd	128a	24abcd	42,3f	128,7bcd	85,7a
<i>Po. subvermispora</i>	186,4de	155,6abcd	20,8ab	39,6f	165,6de	116ab
<i>Pha. chrysosporium</i>	183,2cde	143,9abc	26bcde	24abcd	157,2cde	119,9abc
<i>Py. cinnabarinus</i>	157,2abcd	165,8abcd	19,7a	43,5fg	137,5bcd	122,3abc
<i>Pl. pulmonarius</i>	185de	189,6de	24abcd	27,3de	161de	162,3de

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

3.3.4. Macro y micronutrientes

Los niveles de macronutrientes del alpeorujo aumentaron en la mayoría de los casos significativamente tras la incubación con los hongos saprobios.

Respecto al contenido de nitrógeno, se observó un aumento de este nutriente en la incubación durante 2 semanas con los hongos *F. oxysporum*, *C. rígida*, *Po. subvermispota* y *Pha. chrysosporium*; mientras que la incubación de 20 semanas los hongos que aumentaron la concentración de nitrógeno fueron *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *Ph. radiata* y *Pl. pulmonarius*. La incubación con los hongos mostró *Po. subvermispota*, *Pha. chrysosporium* y *Py. cinnabarinus* mostró valores de concentración de N inferiores a los obtenidos en el alpeorujo control (Tabla 3).

La incubación de alpeorujo con hongos saprobios supuso en la mayoría de los casos un aumento del contenido de potasio. En el caso de *F. lateritium*, *Pa. farinosus* y *Ph. radiata* incubado durante 2 semanas dieron valores de potasio similares al control, sin embargo se alcanzaron valores muy superiores al control, tras su incubación durante 20 semanas. El caso contrario se observó en las incubaciones con los hongos *C. rígida* y *Pha. chrysosporium*, ya que su incubación durante 2 semanas supuso un aumento del porcentaje de potasio respecto al control, mientras que en incubaciones de 20 semanas se obtuvieron valores similares a este. Hubo otros hongos, *F. oxysporum*, *Po. subvermispota*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius* que independientemente del tiempo de incubación, el contenido de potasio se vió incrementado en mayor o menor medida (Tabla 3).

El contenido de sodio aumentó con la incubación de todos los hongos estudiados, salvo en el caso de *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*, aunque cada hongo siguió una pauta de comportamiento diferente. Los hongos saprobios que aumentaron el contenido de sodio del alpeorujo, excepto *C. rígida* y *Po. subvermispota*, al aumentar el tiempo de incubación alcanzaron porcentajes superiores al de alpeorujo control. Cabe destacar el hongo *Pha. chrysosporium* que tras su incubación durante 20 semanas, cuadruplicó el contenido de sodio (Tabla 3).

Los resultados obtenidos respecto al contenido de magnesio muestran en todos los casos un aumento de este para los dos tiempos de incubación estudiados. Cabe destacar que la incubación con los hongos *C. rígida*, *Po. subvermispota* y *Pha. chrysosporium* dio lugar a un mayor aumento en el contenido de magnesio tras su incubación durante 2 semanas que cuando se incubaron durante 20 semanas. El hongo *C. rígida* incubado durante 2 semanas fue el que provocó el mayor aumento del porcentaje de magnesio (Tabla 3).

La incubación del alpeorajo con los hongos saprobios provocó un aumento generalizado del contenido de calcio, solo hubo dos hongos, *F. lateritium* y *Pa. farinosus*, que tras 20 semanas de incubación disminuyeron el porcentaje de calcio en dicho residuo (Tabla 3).

En la Tabla 3 se observa asimismo un leve aumento en el porcentaje de fósforo tras la incubación de los hongos saprobios durante 20 semanas, la excepción corresponde al hongo *Py. cinnabarinus* que disminuyó el contenido de fósforo. También cabe destacar que los dos hongos *C. rigida* y *Pha. chrysosporium*, aumentan los niveles de fósforo cuando se incuban durante 2 semanas, sin embargo no modifican dichos niveles tras su incubación durante 20 semanas (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de nitrógeno, potasio, sodio, magnesio, calcio y fósforo de alpeorajo incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	N (g/Kg)		K (g/Kg)		Na (g/Kg)		Mg (g/Kg)		Ca (g/Kg)		P (g/Kg)	
	2s	20s	2s	20s	2s	20s	2s	20s	2s	20s	2s	20s
No inoculado	18,7d	18,7d	30,54a	30,5a	0,17ab	0,17ab	3,8a	3,8a	13,6b	13,6b	2,11cd	2,11cd
<i>F. lateritium</i>	18,7de	20,7f	30,3a	39,9d	0,19abcd	0,22defg	4,2d	5,1fg	13,5b	11,4a	2,2def	2,4gh
<i>F. oxysporum</i>	20,6f	22,4g	37,3c	40,7d	0,29i	0,27hi	4,5e	5,2fgh	14,4c	15,7de	2,2ef	2,6ij
<i>Pa. farinosus</i>	18,4d	24,7h	31,44ab	44,2e	0,21cdef	0,26ghi	3,9ab	5,4h	13,8b	11,2a	1,9bc	2,76k
<i>C. rigida</i>	20,8f	17,9cd	41,5d	30,8a	0,23efgh	0,17abc	6,3i	3,9abc	18,3k	14,7c	2,9l	2de
<i>Ph. radiata</i>	18,7d	20f	32,1ab	40,7d	0,17abc	0,25fghi	4,5e	4,9f	16,2fg	17,4i	2,3fg	2,5hi
<i>Po. subvermispora</i>	20,3f	12,3a	40,7d	32,4ab	0,19abcd	0,16a	5,2gh	4,5e	18jk	16ef	2,4gh	2,5hi
<i>Pha. chrysosporium</i>	23,2g	15,8b	41,5d	31,8ab	0,24efgh	0,41j	4,9f	4,1cd	16,7h	15,6de	2,6ij	2de
<i>Py. cinnabarinus</i>	18,3cd	17,3c	32,4ab	33,4b	0,18abc	0,16a	4,2d	4,5e	16ef	16,5gh	1,8ab	1,6a
<i>Pl. pulmonarius</i>	18,9cd	19,8ef	31,3ab	33,4b	0,2bcde	0,18abc	4bcd	5fg	15,4d	17,7ij	2,1de	2,6ij

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

El contenido de hierro, aumentó considerablemente con la incubación durante 20 semanas con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum* y *Pa. farinosus*. Como ocurrió en el caso del contenido de potasio, los hongos *C. rigida* y *Pha. chrysosporium* aumentaron los niveles de hierro cuando se incubaron durante 2 semanas, no modificando dichos niveles tras su incubación durante 20 semanas. El resto de hongos aumentaron el contenido de hierro por igual para ambos tiempos de incubación 2 y 20 semanas (Tabla 4).

Los niveles de cobre del alpeorajo aumentaron en gran medida con la incubación durante 20 semanas con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus* y *Pha. chrysosporium*. El resto de hongos mantuvo constantes o disminuyó los niveles de cobre para los tiempos de incubación de 2 y 20 semanas (Tabla 4).

Los estudios de la cantidad de zinc en alpeorajo tratado, muestran que la incubación con todos los hongos ensayados aumentaron los niveles de zinc salvo en el caso de *F. lateritium*. El incremento en los niveles de Zn fueron mayores en incubaciones de los hongos largas salvo en el caso de *C. rigida*, *Po. subvermispora* y *Pha. chrysosporium* (Tabla 4).

El contenido de manganeso del alpeorajo tratado aumentó con todas las incubaciones con los hongos saprobios. Caben destacar los resultados obtenidos en la incubación con *F. oxysporum* y *Pa. farinosus* durante 20 semanas así como la incubación con *C. rigida* durante 2 semanas que supuso un notable aumento de los niveles de manganeso (Tabla 4).

Respecto a los otros metales pesados analizados (Cd, Ni, Co y Pb), ninguno de ellos se detectaron por la metodología analítica utilizada (espectrofotometría de absorción atómica).

Tabla 4. Concentración de hierro, cobre, zinc y manganeso de alpeorujo incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Fe (g/Kg)		Cu (mg/Kg)		Zn (mg/Kg)		Mn (mg/Kg)	
	2s	20s	2s	20s	2s	20s	2s	20s
No inoculado	1,1a	1,1a	68,97bcd	68,97bcd	65,24a	65,24a	46,5a	46,5a
<i>F. lateritium</i>	1,1ab	1,75i	72,25bcd	108,39e	68,49ab	65,65a	51,09abc	61,9e
<i>F. oxysporum</i>	1,53efg	1,9j	78,82cd	105,1e	68,9ab	73,35abc	57,1cde	70,29f
<i>Pa. farinosus</i>	1,1b	1,95j	68,97bcd	108,39e	68,49ab	74,97abcd	46,29a	70,29f
<i>C. rigida</i>	2j	1,2b	70,7bcd	58,9abc	116,36g	70,22ab	69,7f	46,5a
<i>Ph. radiata</i>	1,5ef	1,66hi	70,7bcd	53ab	80,97abcde	79,74abcd	55,8bcde	61,96e
<i>Po. subvermispora</i>	1,6gh	1,4de	53ab	53ab	102,02fg	89,25cdef	61,96e	55,8bcde
<i>Pha. chrysosporium</i>	1,7i	1,3c	53ab	86,36de	98,78efg	78,17abcd	60,4de	49,56ab
<i>Py. cinnabarinus</i>	1,4d	1,4de	58,9abc	56,93abc	75,03abcd	81,3abcde	51,13abc	54,23bcd
<i>Pl. pulmonarius</i>	1,3c	1,56fg	41,2a	54,96abc	86bcdef	92,4def	51,1abc	60,4de

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

3.3.5. Lignina, hemicelulosa y celulosa

Los resultados obtenidos de lignina ácido detergente muestran que la incubación del alpeorujo con hongos saprobios durante 2 semanas, no modificó de forma significativa el contenido en lignina, salvo en el caso del hongo *Pha. chrysosporium*, que provocó un leve aumento. La incubación durante 20 semanas con todos los hongos saprobios estudiados, excepto *C. rigida*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*, supuso un aumento significativo del contenido en lignina respecto al alpeorujo no inoculado (Tabla 5).

El contenido de hemicelulosa en el alpeorujo aumentó con la incubación con hongos saprobios. La incubación del hongo durante 2 semanas no modificó los niveles de hemicelulosa, en el caso de *Pa. farinosus*, *C. rigida* y *Pl. pulmonarius*, sin embargo, el resto de hongos dieron lugar a diferencias significativas con respecto al alpeorujo control. Todos los hongos estudiados incubados durante 20 semanas incrementaron el contenido de hemicelulosa, excepto *C. rigida* (Tabla 5).

En cuanto al contenido de celulosa se refiere, las inoculaciones de los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium* y *Py. cinnabarinus* durante 2 semanas causaron incrementos significativos de este, mientras que el resto de los hongos inoculados no modificaron los niveles del contenido de celulosa. La inoculación del alpeorujo durante 20 semanas produjo también un aumento en la concentración de celulosa en la mayoría de los hongos saprobios utilizados salvo en el caso de *F. lateritium*, *Po. subvermispora* y *Pl. pulmonarius* (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido en lignina ácido detergente, hemicelulosa y celulosa de alpeorujo incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispota*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Lignina ácido detergente (g/100g alpeorujo)		Hemicelulosa (g/100g alpeorujo)		Celulosa (g/100g alpeorujo)	
	2s	20s	2s	20s	2s	20s
No inoculado	24,36abcd	25,22abcd	9,97abc	10,4abcd	17,09ab	17,88abc
<i>F. lateritium</i>	24,30abcd	27,9cdef	12,32fg	12,78gh	20,65cd	18,55abc
<i>F. oxysporum</i>	25,4abcd	30,3ef	14,17ij	14,1ij	20,64cd	19,76abcd
<i>Pa. farinosus</i>	24,12abcd	28,42def	9,99abc	13,78hij	17,96abc	19,64abcd
<i>C. rigida</i>	25,32abcd	23,66ab	9,89ab	10,61abcd	17,17ab	22,2d
<i>Ph. radiata</i>	25,5abcd	29,99ef	10,87bcd	13,52hij	19,26abcd	19,86bcd
<i>Po. subvermispota</i>	25abcd	30,69g	11,24def	14,42j	18,38abc	18,3abc
<i>Pha. chrysosporium</i>	26,99abcdef	30,59g	11,06de	13,11ghi	18,79abc	22,06d
<i>Py. cinnabarinus</i>	25,8abcd	26,31abcde	10,97bcd	11,05cde	20,18cd	20,49cd
<i>Pl. pulmonarius</i>	22,98a	27,17bcdef	9,73a	12,17efg	16,81a	19,33abcd

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

3.3.6. Azúcares totales

En primer lugar se estudió el efecto del tiempo de incubación del alpeorujó con distintos hongos saprobios sobre la cantidad de azúcares totales. De forma general, se produjo un descenso significativo del contenido de azúcares totales del alpeorujó tras la incubación con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum* y *Pa. farinosus* (Tabla 6). Durante las primeras semanas de incubación del alpeorujó con los hongos saprobios ensayados los niveles de azúcares totales permanecieron invariables. Se produjo un descenso significativo a partir de las octava semana en los hongos *F. lateritium* y *Pa. farinosus*, mientras que *F. oxysporum* no modificó el contenido de azúcares hasta las 20 semanas de incubación. Se decidió seleccionar los tiempos de incubación de 2 y 20 semanas para estudios posteriores con otros hongos saprobios.

Tabla 6 . Contenido en azúcares totales (mg/g alpeorujó) de alpeorujó incubado o no durante 2, 4, 8 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum* y *Pa. farinosus*.

Tratamiento	Azúcares totales (mg/g)			
	2s	4s	8s	20s
No inoculado	113,4a	113,4a	113,4a	113,4a
<i>F. lateritium</i>	45,51c	41,84b	14,29a	12,39a
<i>F. oxysporum</i>	43,15d	50,17c	33,62b	27,30a
<i>Pa. farinosus</i>	67,09d	58,35c	44,99b	26,28a

Los valores de cada fila seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

En estudios sobre el contenido de azúcares totales en alpeorujó incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispóra*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius* se pudo observar en casi la totalidad de los hongos un descenso de la cantidad de azúcares totales. La Fig. 3 muestra como la incubación del alpeorujó con los hongos *C. rigida*, *Pha. chrysosporium* y *Pl. pulmonarius* no modificó el contenido en azúcares totales a las dos semanas de incubación, sin embargo, el resto de hongos dieron lugar en mayor o menor medida a un descenso de dicho contenido. La cantidad de azúcares totales del alpeorujó incubado durante 20

semanas con cualquiera de los hongos estudiados disminuyó considerablemente con respecto al alpeorujito no inoculado.

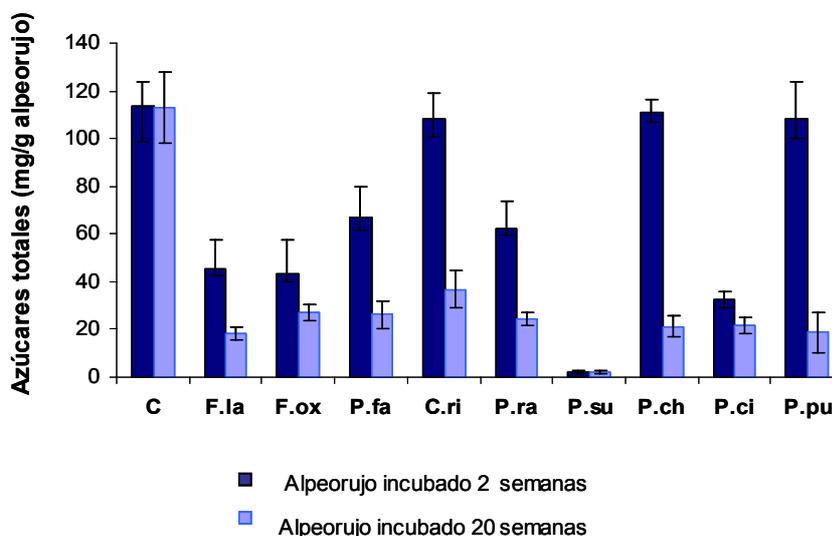


Fig. 3. Azúcares totales de alpeorujito incubado o no (C) durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Las barras en cada columna indican el error estándar.

3.3.7. Contenido fenólico

La Tabla 7 muestra que el contenido fenólico del extracto acuoso de muestras de alpeorujito sin inocular e incubado durante 2 semanas fue 18,35 g/Kg. La fracción de fenoles extractados con acetato de etilo, constituido principalmente por los componentes monocíclicos del alpeorujito, ascendió a un 40,7% del contenido total de fenoles solubles en agua. Una separación realizada por ultrafiltración demostró que el contenido de fenoles solubles en agua en fracciones de peso molecular mayores de 100 kDa (F1) y menores de 100 kDa (F2) fueron 5,35 y 13 g/Kg, respectivamente (Tabla 7), por lo que, el porcentaje de las fracciones F1 y F2 fue 29,1 y 70,9%, respectivamente. El contenido total de fenoles solubles en agua de alpeorujito no se modificó con la incubación durante 2 semanas con el hongo *F. lateritium*, mientras que la incubación durante 20 semanas produjo una reducción del 23%. Sin embargo, el contenido total de fenoles solubles en agua de alpeorujito aumentó levemente con la incubación durante 2 semanas con el hongo *F. oxysporum*, mientras que la incubación con dicho durante 20 semanas produjo un leve descenso. Se produjo un cambio evidente en el porcentaje de fenoles solubles en agua de las fracciones F1 y F2, así, podemos observar como la fracción F1 aumentó desde 29,1 (control) a 56,2% y 52,8%

con la incubación con los hongos *F. lateritium* y *F. oxysporum*, respectivamente. Podemos señalar como efectos más destacados de los resultados obtenidos, una disminución del contenido total de fenoles solubles en agua con la incubación del alpeorajo con el hongo *F. lateritium* durante 20 semanas, aumentando la fracción correspondiente a peso molecular mayor de 100 kDa con respecto a la de peso molecular menor de 100 kDa en la incubación con los dos hongos ensayados.

El contenido de los fenoles extractados con acetato de etilo se redujo notablemente (81,6% y 65%) tras 20 semanas de incubación con los hongos *F. lateritium* y *F. oxysporum*.

Tabla 7. Contenido de fenoles expresado en g/Kg alpeorajo presentes en el extracto acuoso total, en las fracciones F1 (PM > 100 kDa) y fracción F2 (PM < 100 kDa), y en los extractos metanólico y de acetato de etilo de muestras de alpeorajo incubado o no durante 2 y 20 semanas con los hongos *F. lateritium* y *F. oxysporum*.

Tratamiento	Extracto acuoso	Fracción F1	Fracción F2	Extracto de acetato de etilo
Control	18,35b	5,35a	13c	7,44b
<i>F. lateritium</i> (2 semanas)	18,5b	4,31a	14,26c	7,78b
<i>F. lateritium</i> (20 semanas)	14,11a	7,93b	6,18a	1,37a
<i>F. oxysporum</i> (2 semanas)	18,71b	4,21a	14,5c	6,56b
<i>F. oxysporum</i> (20 semanas)	18,16b	9,59c	8,56b	2,57a

Los valores de cada columna seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

Análisis de los compuestos fenólicos simples

Determinación de fenoles de extracto metanólico-agua de alpeorajo

El análisis mediante HPLC del extracto metanol-agua del alpeorajo control nos reveló que los principales fenoles monoméricos detectados fueron hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol), hidroxitirosol 4-glucósido, tirosol (4-hidroxifeniletanol) y salidrósido (tirosol glucósido) (Fig. 4 y 5). También se detectaron en dicho análisis otros compuestos fenólicos minoritarios como luteolina 7-glucósido, rutina y oleuropeina (Fig. 4 y 5). La existencia de todos estos compuestos fenólicos se confirmó mediante HPLC-MS y se pudo constatar que la concentración de hidroxitirosol 4-glucósido fue la

mayor encontrada de fenoles monoméricos en el alpeorujó seco y extractado (4,792 g/Kg de alpeorujó) seguido del tirosol glucósido, hidroxitirosol y tirosol con 2,014, 1,824, y 0,682 g/Kg de alpeorujó respectivamente.

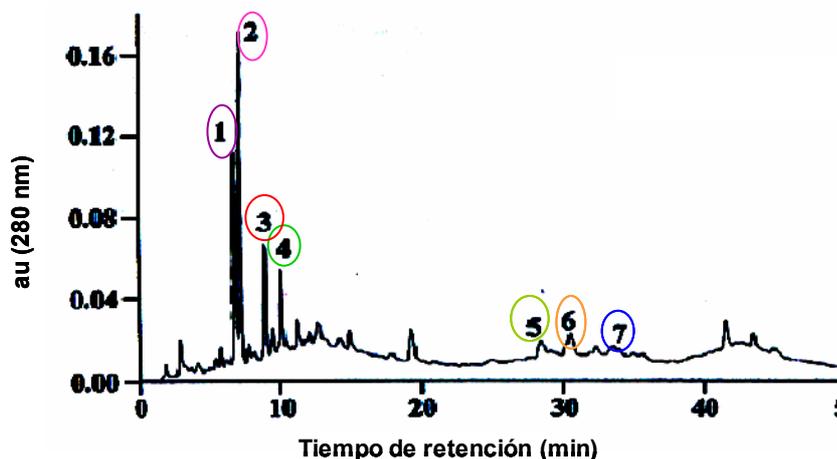
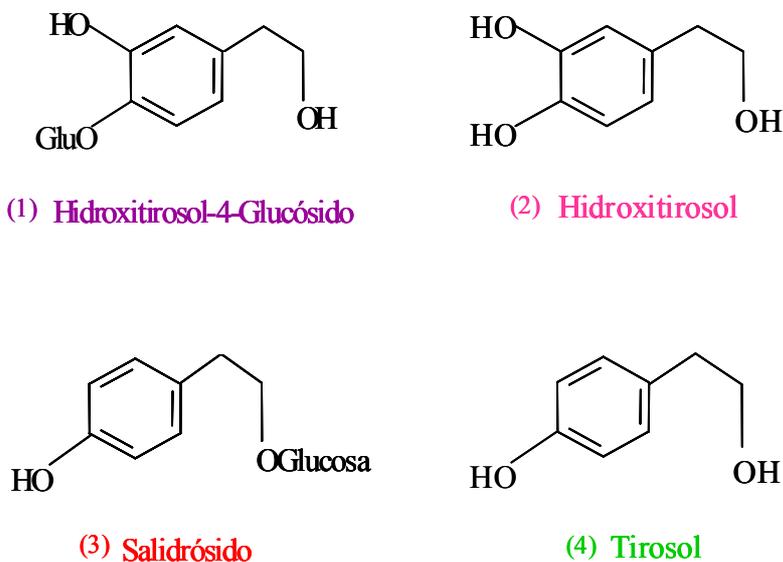


Fig. 4. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos extractados con metanol-agua de alpeorujó no incubado o alpeorujó control. Los compuestos fenólicos identificados de acuerdo a sus tiempos de retención fueron: (1) hidroxitirosol 4-glucósido, (2) hidroxitirosol, (3) salidrósido, (4) tirosol, (5) luteolina 7-glucósido, (6) rutina y (7) oleuropeina.

La estructura química de los compuestos fenólicos detectados en extracto metanol-agua de alpeorujó se detallan en la Figura 5.



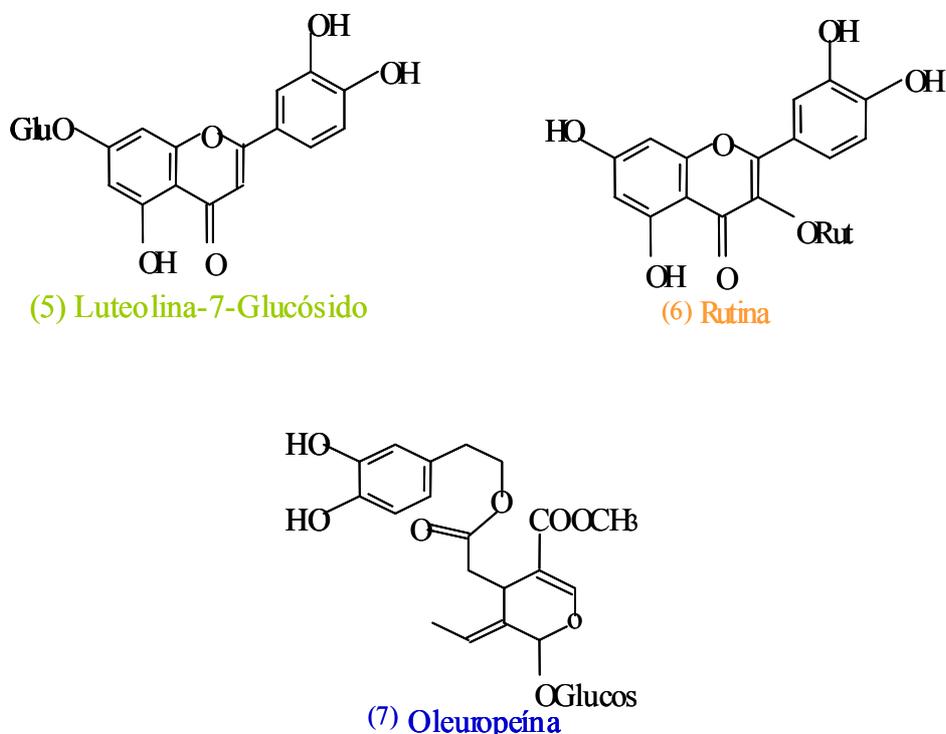


Fig. 5. Estructura química de los compuestos fenólicos identificados en extracto metanol-agua de alpeorujó seco y extractado.

Se ha observado que el tratamiento del alpeorujó con *C. rigida* durante 20 semanas provocó la eliminación de todos los fenoles monoméricos presentes en dicho residuo (Fig. 6). Este período de tiempo parece que fue suficiente para llevarse a cabo la degradación, sin embargo la incubación de dicho residuo durante 2 semanas solo generó un leve descenso de los fenoles. Este efecto descrito para *C. rigida* fue también observado en los tratamientos de alpeorujó con los otros hongos saprobios ensayados, en todos los casos a las 20 semanas de incubación se eliminaron los fenoles monoméricos descritos pero se observó un diferente comportamiento entre los hongos saprobios utilizados en cuanto a la capacidad de eliminar los compuestos fenólicos a las 2 semanas de incubación.

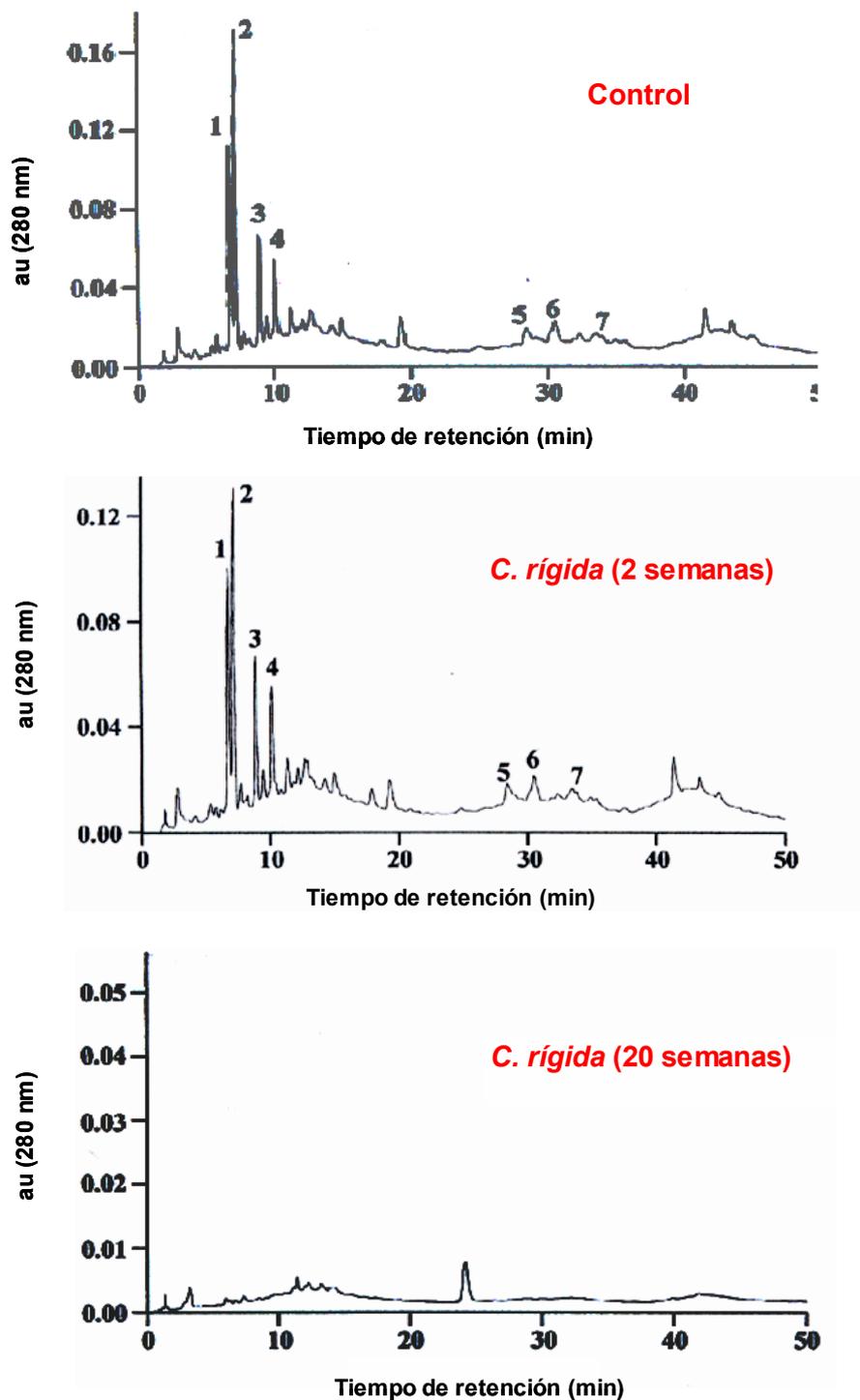


Fig. 6. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos presentes en alpeorujos incubado o no durante 2 y 20 semanas con el hongo *C. rigida*. Picos: (1) hidroxitirosol 4-glucósido, (2) hidroxitirosol, (3) salidróside, (4) tirosol, (5) luteolina 7-glucósido, (6) rutina y (7) oleuropeína.

La Figura 7 muestra el efecto de la incubación del alpeorujó con los distintos hongos saprobios durante 2 semanas sobre los principales fenoles monoméricos presentes en dicho residuo. Se puede observar que los hongos *Py. cinnabarinus* y *F. lateritium* eliminaron prácticamente del alpeorujó el hidroxitirosol y su glucósido mientras que las concentraciones de tirosol permanecieron constantes comportandose como el fenol más recalcitrante. De todos los hongos saprobios estudiados, sólo *Pha. chrysosporium* disminuyó totalmente el compuesto tirosol del alpeorujó tras 2 semanas de incubación. *Pl. pulmonarius* y *C. rigida* fueron muy poco activos en la disminución de compuestos fenólicos del alpeorujó, la concentración de tirosol y su glucósido permanecieron constantes después de 2 semanas de incubación, estos hongos sólo disminuyeron levemente la concentración de hidroxitirosol y su glucósido. En contraste, *Ph. radiata* y especialmente *F. oxysporum* fueron los hongos más activos de entre todos los estudiados, ya que eliminaron hidroxitirosol y su glucósido y la mayor parte de tirosol y su glucósido. Los hongos saprobios *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium* y *Pa. farinosus* tienen comportamientos particulares, así el hongo *Po. subvermispora* degradó totalmente el glucósido del hidroxitirosol, un 90% de hidroxitirosol y en menor medida el tirosol y su glucósido. Comportamiento parecido mostró el hongo *Pha. chrysosporium*, que actuó disminuyendo preferentemente los fenoles simples tirosol e hidroxitirosol, dejando invariables las concentraciones de los glucósidos correspondientes. De todos los hongos ensayados, el que presentó el comportamiento más peculiar y sorprendente fue *Pa. farinosus* ya que hidrolizó los fenoles glucosilados en sus fenoles simples hidroxitirosol y tirosol (Fig. 7). La cantidad de hidroxitirosol que se cuantificó en alpeorujó incubado durante 2 semanas con este hongo saprobio fue la suma de la concentración inicial (12 mM) y la obtenida de la hidrólisis de hidroxitirosol glucosilado(15 mM). Este mismo efecto pudo observarse en el caso del tirosol.

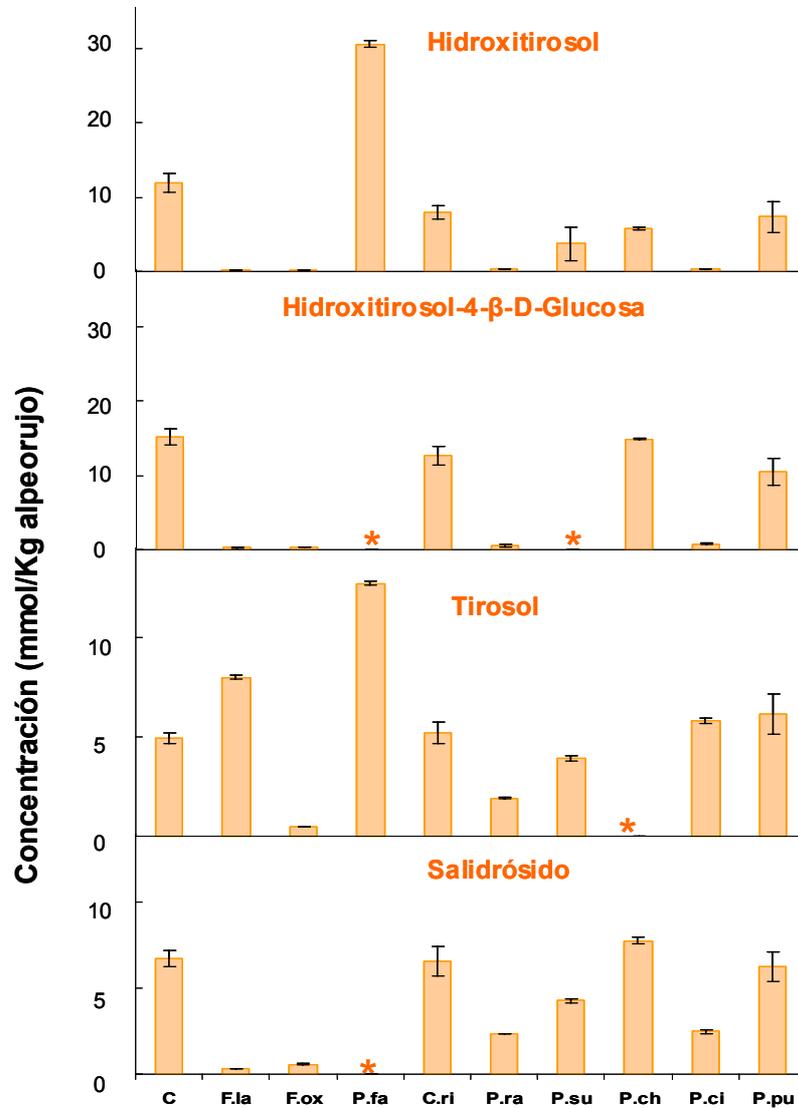


Fig. 7. Concentración de hidroxitirosol, hidroxitirosol 4-glucósido, tirosol y salidroside en alperujo, incubado o no (C) durante 2 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Los asteriscos indican valores nulos. Las barras en cada columna indican el error estándar.

Los resultados obtenidos para los cuatro fenoles monoméricos mayoritarios se completaron con el estudio de los tres compuestos minoritarios obtenidos oleuropeina y los flavonoides luteolina 7-glucósido y rutina (Tabla 8). La mayoría de los hongos saprobios utilizados en la incubación del alpeorujó durante 2 semanas disminuyeron la concentración de estos tres compuestos aunque al igual que ocurría con los fenoles mayoritarios cada hongo tuvo un comportamiento característico para cada uno de los compuestos fenólicos. Son de destacar *Pa. farinosus* que aumentó las concentraciones de rutina y *Pha. chrysosporium* las de oleuropeina y rutina. No se detectaron ninguno de los tres compuestos fenólicos en el tratamiento con el hongo *F. oxysporum* mientras que *F. lateritium* redujo totalmente la concentración de luteolina 7-glucósido.

Tabla 8. Concentración de luteolina 7-glucósido, rutina y oleuropeina (mmol/Kg alpeorujó) en alpeorujó, incubado o no (Control) durante 2 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Luteolin 7-glucósido (mmol/kg)	Rutina (mmol/kg)	Oleuropeina (mmol/kg)
Control	0,341cd	0,378de	0,763d
<i>F. lateritium</i>	nd	0,060a	0,124a
<i>F. oxysporum</i>	nd	nd	nd
<i>Pa. farinosus</i>	0,111a	0,445e	0,524bc
<i>C. rígida</i>	0,297bc	0,293cd	0,429b
<i>Ph. radiata</i>	0,043a	0,130ab	0,200a
<i>Po. subvermispora</i>	0,096a	0,240c	0,391b
<i>Pha. chrysosporium</i>	0,418d	0,426e	0,647cd
<i>Py. cinnabarinus</i>	0,069a	0,202bc	0,220a
<i>Pl. pulmonarius</i>	0,220b	0,290cd	0,399b

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).

Determinación de fenoles de extracto de acetato de etilo

El análisis mediante espectrometría de masas (GC-MS) del extracto de acetato de etilo de alpeorujos incubado sin inocular dio lugar a la identificación de 9 compuestos aromáticos dos de los cuales, los ácidos 3,4-dimetoxicinámico y 4-metoxicinámico, compuestos no fenólicos (Fig. 8). Los compuestos fenólicos identificados numerados de acuerdo con sus tiempos de retención fueron: catecol, 4-metilcatecol, tirosol, hidroxitirosol, ácido vainillico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico. Su cuantificación realizada mediante análisis de cromatografía líquida de alta eficacia de intercambio iónico (RP-HPLC) mostró que los componentes más abundantes en el alpeorujos control eran hidroxitirosol, tirosol y catecol, con concentraciones de 2,333, 0,640 y 0,367 mg/Kg alpeorujos (Tabla 9).

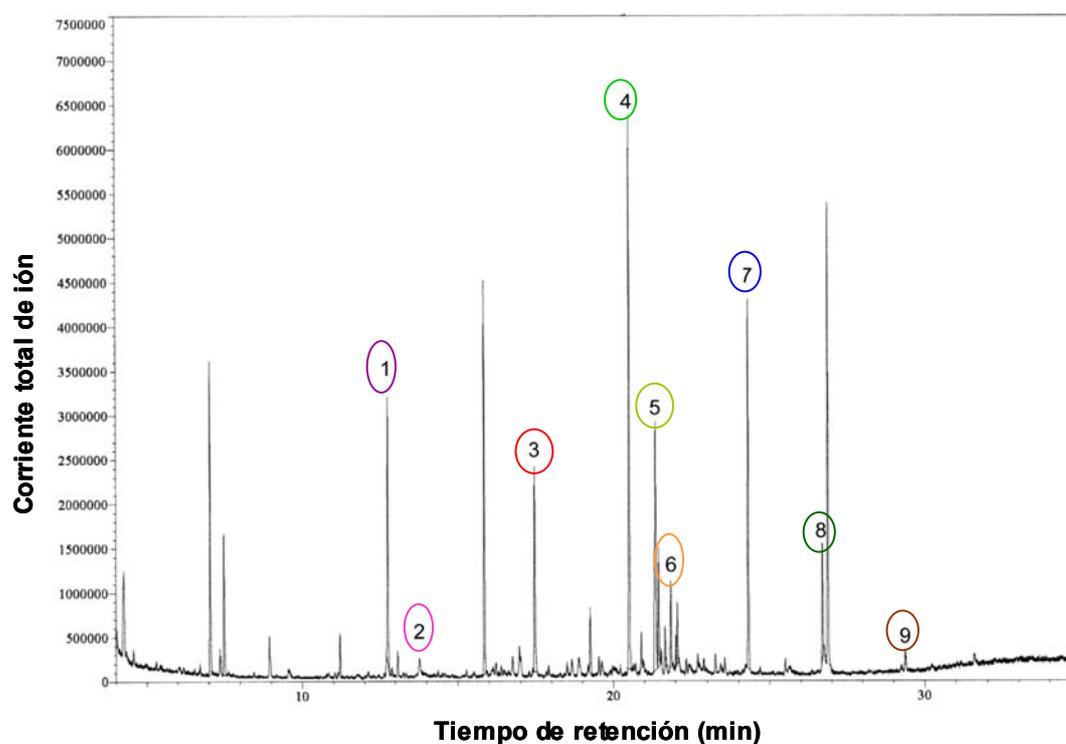


Fig. 8. Cromatograma GC-MS (corriente total de ión) de compuestos fenólicos extractados con acetato de etilo de alpeorujos no incubado o alpeorujos control. Los compuestos fenólicos identificados de acuerdo a sus tiempos de retención fueron: (1) catecol, (2) 4-metilcatecol, (3) tirosol, (4) hidroxitirosol, (5) ácido vainillico, (6) ácido p-cumárico, (7) ácido 4-metoxicinámico, (8) 3,4-dimetoxicinámico y (9) ácido ferúlico.

La estructura química de los compuestos fenólicos detectados en extracto de acetato de etilo de alpeorujó se detallan en la Figura 9.

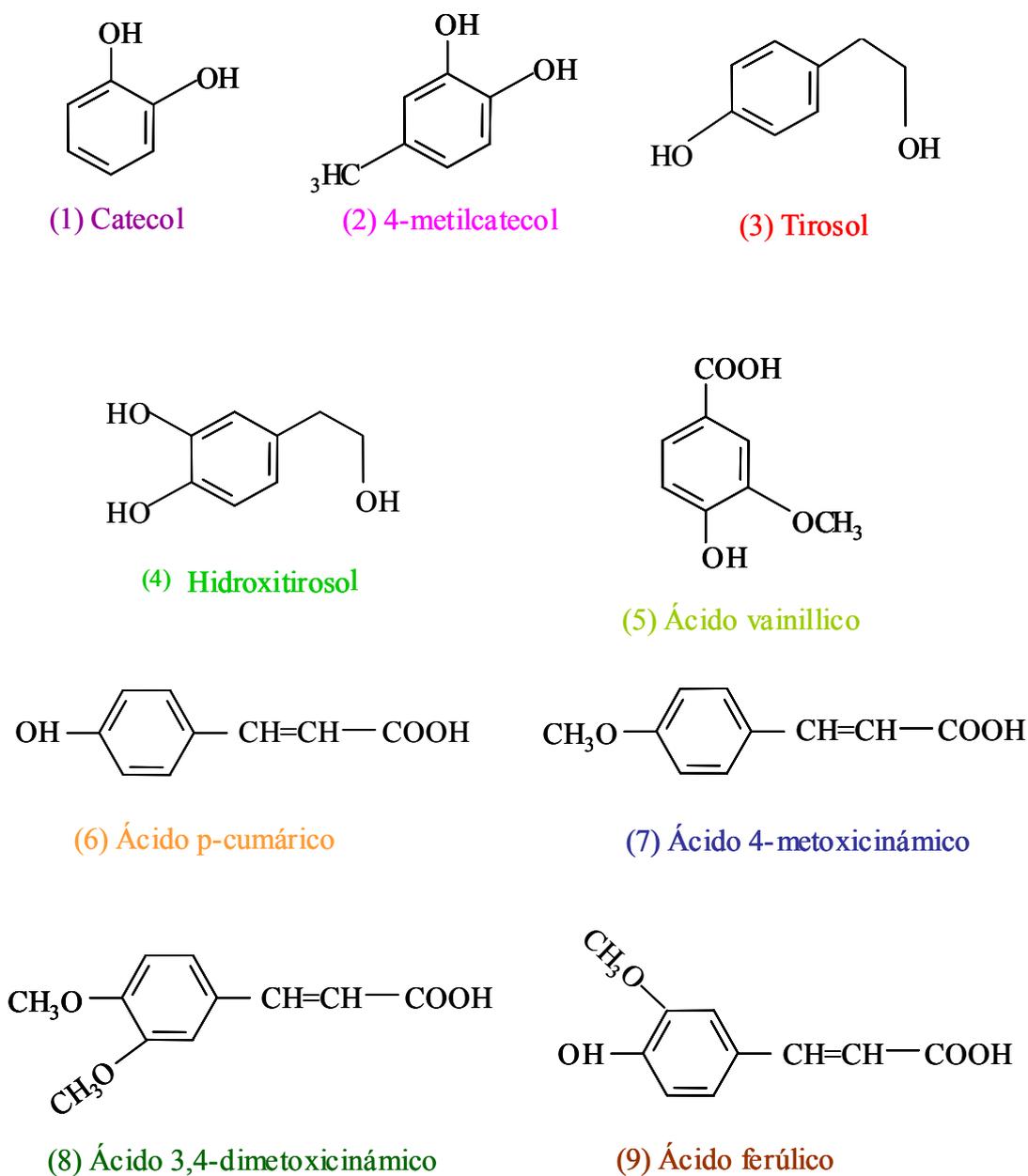


Fig. 9. Estructura química de compuestos fenólicos identificados en extracto de acetato de etilo de alpeorujó seco y extractado.

La incubación del alpeorajo durante 2 semanas con el hongo *F. lateritium* provocó la disminución de algunos compuestos monocíclicos, tales como catecol, 4-metilcatecol y ácido ferúlico y el incremento de otros compuestos como hidroxitirosol y tirosol con aumentos del 9,2 y 14,5%, respectivamente. Sin embargo la incubación con el hongo durante 2 semanas con el hongo *F. oxysporum* supuso la completa eliminación de catecol y ácido vainillico y el incremento de ácido 3,4-dimetoxicinámico con aumento del 32,6% (Tabla 9). El alpeorajo incubado con *F. lateritium* y *F. oxysporum* durante 20 semanas produjo la completa eliminación de hidroxitirosol, catecol y del ácido 3,4-dimetoxicinámico. Los compuestos más recalcitrantes de extractos de acetato de etilo de alpeorajo fueron tirosol, 4-metilcatecol y los ácidos ferúlico y 4-metoxicinámico para la incubación con el hongo *F. lateritium* y tirosol y ácido p-cumárico para la incubación con el hongo *F. oxysporum* (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración de compuestos aromáticos simples (mmol/Kg alpeorujo) en alpeorujo, incubado o no (Control) durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*.

Compuestos aromáticos simples	Alpeorujo Control	Alpeorujo incubado			
		<i>F. lateritium</i>		<i>F. oxysporum</i>	
		2 semanas	20 semanas	2 semanas	20 semanas
Hidroxitirosol	15	16,42±0,5	n.d.	9,92±0,1	n.d.
Catecol	3,3	1,59±0,1	n.d.	n.d.	n.d.
Tirosol	4,63	5,3±0,5	0,53±0,01	4,25±0,5	0,21±0,01
Ácido vainillico	0,08	0,09±0,001	n.d.	n.d.	0,04±0,01
4-metilcatecol	0,99	0,38±0,1	0,074±0,01	0,264±0,1	0,165±0,01
Ácido p-cumárico	0,13	0,033±0,01	0,0048±0,01	0,08±0,01	0,05±0,1
Ácido ferúlico	0,61	0,131±0,1	0,144±0,1	0,15±0,1	0,114±0,1
Ácido 3,4-dimetoxicinámico	0,52	0,186±0,1	n.d.	0,69±0,1	n.d.
Ácido 4-metoxicinámico	0,28	0,37±0,001	0,142±0,5	0,28±0,001	n.d.

Los niveles de significancia para las diferencias con el control fueron determinados por el test de Tukey. n.d.: no detectado.

El contenido de APPL del alpeoruj control fue de 20 g/Kg alpeoruj y se modificó tras las respectivas incubaciones de 2 y 20 semanas a concentraciones de 27 y 75 g/Kg alpeoruj, respectivamente con el hongo *F. lateritium* (Fig. 10A). El análisis mediante SEC-HPLC de APPL del alpeoruj control mostró que la fracción principal de este residuo se polimerizó. De hecho, la fracción principal de APPL de alpeoruj control con K_{av} 0,226 y peso molecular de 69 kDa tras la incubación con *F. lateritium* durante 2 semanas se modificó obteniéndose una fracción con un valor más bajo de K_{av} (0,206) y peso molecular superior (84 kDa) (Fig. 10B). Las mayores modificaciones en la distribución de peso molecular de APPL se dieron en el análisis de muestras de alpeoruj incubado durante 20 semanas con el hongo *F. lateritium*. Así, el perfil de elución de estas muestras mostró la aparición de una nueva fracción que se eluyó cercana al volumen muerto de la columna (K_{av} = 0,013, peso molecular \approx 165 kDa) y la presencia de una fracción más lejana (K_{av} = 0,172, peso molecular \approx 92 kDa) (Fig. 10C).

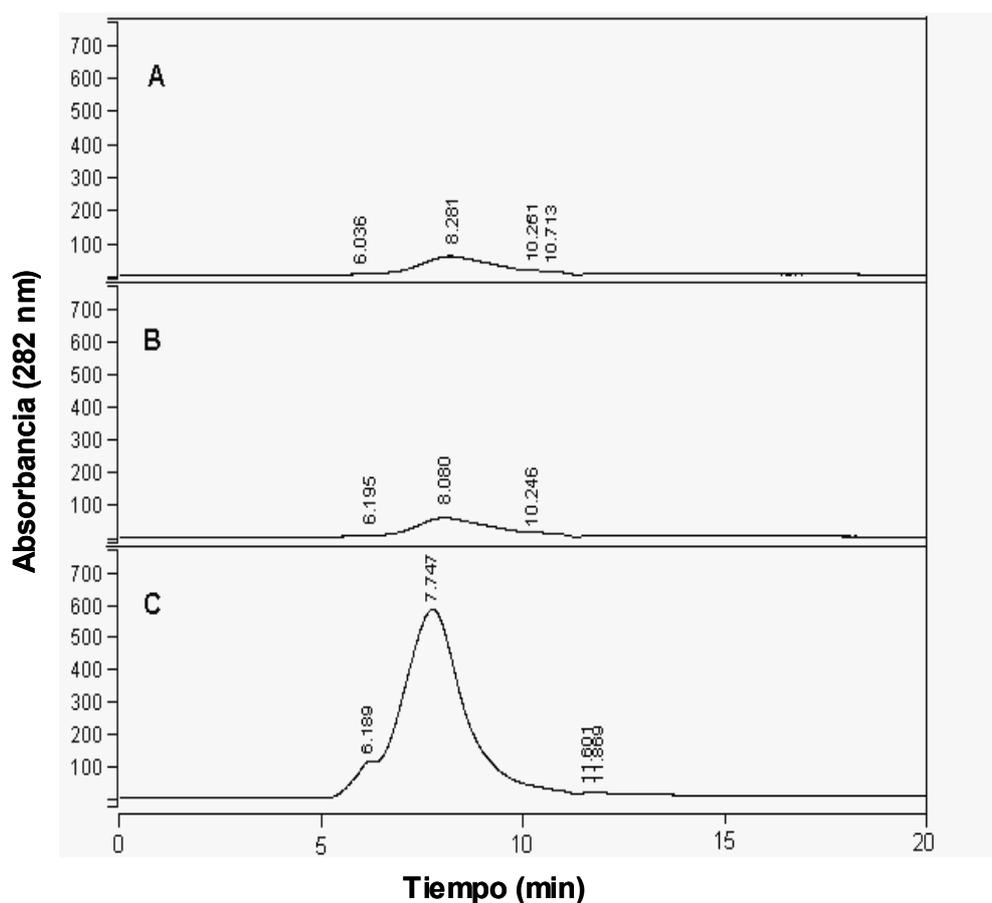


Fig. 10. Cromatograma SEC-HPLC de lignina polimérica precipitable en ácido extractada (APPL) de alpeoruj no incubado o alpeoruj control (A) y alpeoruj incubado durante 2 y 20 semanas con el hongo saprobio *F. lateritium* (B) y (C).

El contenido de APPL del alpeorujó control fue de 20 g/Kg alpeorujó y se modificó tras las respectivas incubaciones de 2 y 20 semanas a concentraciones de 44 y 112 g/Kg alpeorujó, respectivamente con el hongo *F. oxysporum* (Fig. 11A). Al igual que lo observado con el hongo *F. lateritium*, el análisis mediante SEC-HPLC de APPL del alpeorujó control mostró que la fracción principal de este residuo se polimerizó. Así, la fracción principal de APPL de alpeorujó control con K_{av} 0,279 y peso molecular de 36 kDa tras la incubación con *F. oxysporum* durante 2 semanas se modificó obteniéndose una fracción con un valor más bajo de K_{av} (0,256) y peso molecular superior (68 kDa) (Fig. 11B). El análisis de muestras de alpeorujó incubado durante 20 semanas con el hongo *F. oxysporum* mostró la aparición de una fracción principal con un valor de K_{av} 0,262 y peso molecular 64 kDa (Fig. 11C).

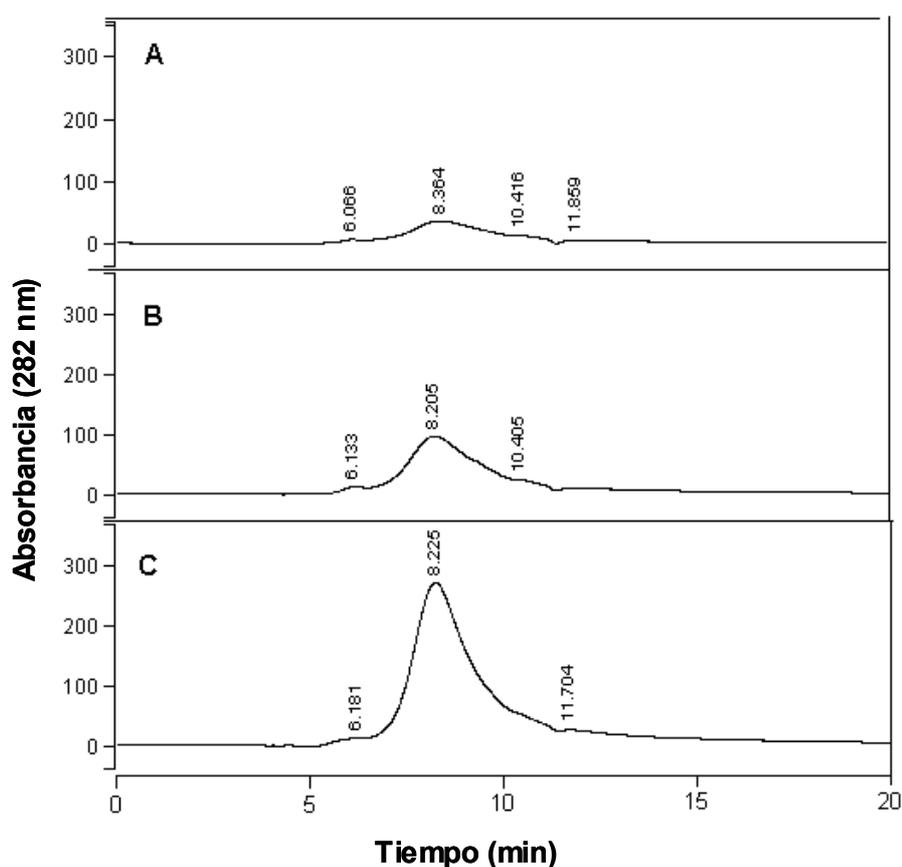


Fig. 11. Cromatograma SEC-HPLC de lignina polimérica precipitable en ácido extractada (APPL) de alpeorujó no incubado o alpeorujó control (A) y alpeorujó incubado durante 2 y 20 semanas con el hongo saprobio *F. oxysporum* (B) y (C).

3.4. Mecanismos de eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó por los hongos saprobios

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primero, el factor alpeorujó incubado con los hongos saprobios, contenía 10 tratamientos: alpeorujó control (C), alpeorujó inoculado con *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*. El segundo factor consistió en los distintos tiempos de incubación del alpeorujó con los hongos saprobios: 0 y 20 semanas. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Determinaciones

Se realizaron las siguientes determinaciones de actividades enzimáticas según la metodología descrita anteriormente.

Enzimas hidrolíticos

Se realizó el estudio de las actividades endo y exohidrolíticas: actividades: pectinasa, glucanasa y xiloglucanasa, así como las actividades lipasa, esterasa y tanin-acilhidrolasa.

Enzimas ligninolíticos

Se determinaron enzimas fenol oxidasas: manganeso peroxidasa, lacasa y arilalcoholoxidasa.

Resultados

3.4.1. Enzimas hidrolíticos

Actividades endohidrolíticas

En todos los extractos de alpeorujos incubados con los hongos saprobios objeto de estudio se detectaron actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG) (Fig. 1). Aunque los niveles de producción de estas enzimas hidrolíticas fueron variables, se observó que los valores de actividad endoglucanasa y endoxiloglucanasa fueron superiores a los de endopolimetilgalacturonasa.

La actividad endo-PMG en extracto de alpeorujos incubado con *F. oxysporum* y *C. rigida* mostró los valores más bajos, siendo además similares los obtenidos tras la incubación de los hongos 2 y 20 semanas (Fig. 1A). Al aumentar el tiempo de incubación de alpeorujos con los hongos *Pha. chrysosporium* y *Pl. pulmonarius* la actividad endo-PMG se incrementó, sin embargo, el resto de los hongos produjo un descenso de los niveles de actividad enzimática. En general, los mayores valores de actividad endo-PMG se obtuvieron con la incubación durante 2 semanas con los hongos *F. lateritium*, *Pa. farinosus* y *Ph. radiata*.

A diferencia de la actividad endo-PMG, en general se produjo un aumento de la actividad endo-GN al aumentar el tiempo de incubación de los hongos, salvo en el caso de *Ph. radiata* y *Py. cinnabarinus*. Cabe destacar, que la incubación del alpeorujos durante 2 semanas supuso valores muy bajos de actividad mientras que el alpeorujos incubado durante 20 semanas con los hongos *C. rigida*, *Po. subvermispora* y *Pl. pulmonarius* tuvo los niveles más altos (Fig. 1B).

La actividad endo-XG siguió una pauta similar a la descrita para la actividad endo-GN, la actividad del alpeorujos incubado con los hongos saprobios se incrementó con el tiempo de incubación (Fig. 1C). Se detectó actividad en alpeorujos incubado con los diferentes hongos durante 2 semanas aunque los valores fueron muy bajos. Como se observa en la Fig. 1C la actividad endoxiloglucanasa mostró, en general, valores altos en muestras de residuo incubadas con los hongos saprobios objeto de estudio durante 20 semanas.

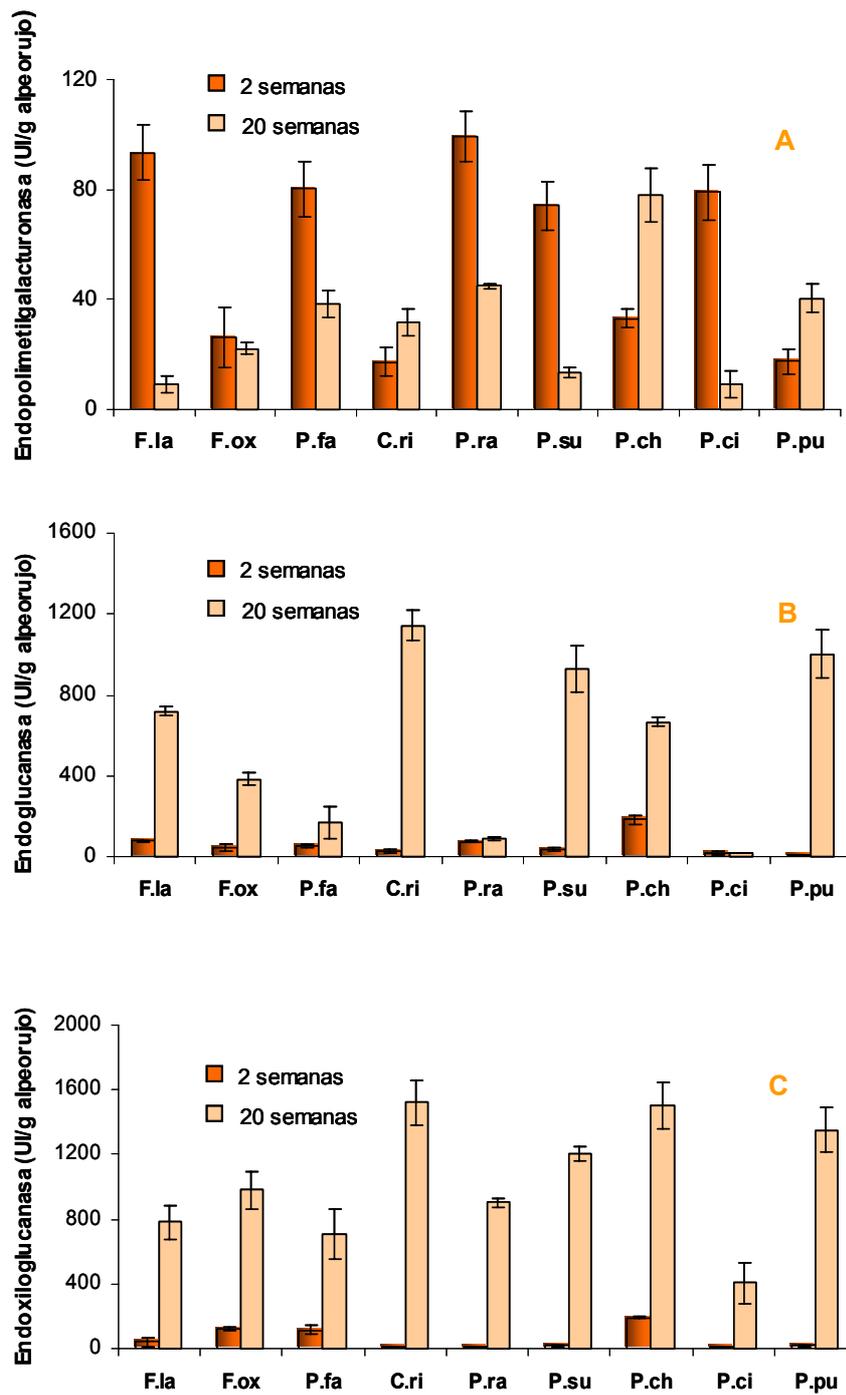


Fig. 1. Actividad endopolimetilgalacturonasa (A), endoglucanasa (B) y endoxiloglucanasa (C) detectada en alperujo inoculado con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu) durante 2 y 20 semanas. Las barras en cada columna indican el error estándar.

Actividades exohidrolíticas

En la Tabla 1 se puede observar la presencia de varias actividades exohidrolíticas implicadas en la depolimerización de los polisacáridos de la pared celular en muestras de alpeorujo incubadas con los hongos saprobios *F. lateritium* y *F. oxysporum* durante 2 y 20 semanas. Durante la incubación con *F. lateritium* las actividades más altas correspondieron a las detectadas tras la incubación de alpeorujo durante 20 semanas, con valores para pectinasa, β -1,4-xilanasa y β -1,4-glucanasa de 9,25, 7,62 y 5,57 UI/g alpeorujo respectivamente. Las actividades celobiohidrolasa y β -glucosidasa permanecieron invariables a lo largo de la incubación de *F. lateritium*.

Con respecto al alpeorujo incubado con el hongo *F. oxysporum*, las actividades hidrolíticas más altas correspondieron a la incubación de 2 semanas, con valores para β -1,4-xilanasa y β -1,4-glucanasa y celobiohidrolasa de 1,48, 1 y 1,19 UI/g alpeorujo respectivamente. Las actividades celobiohidrolasa y β -glucosidasa permanecieron constantes a lo largo del período de incubación.

Tabla 1. Actividades exohidrolíticas detectadas en alpeorujo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* y *F. oxysporum*.

Enzima	Alpeorujo incubado			
	<i>F. lateritium</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	2 semanas	20 semanas	2 semanas	20 semanas
	UI (g alpeorujo) ⁻¹	UI (g alpeorujo) ⁻¹	UI (g alpeorujo) ⁻¹	UI (g alpeorujo) ⁻¹
Pectinasa	5,71±0,39	9,25±0,64	0,27±0,01	n.d.
β-1,4-xilanasa	3,57±0,25	7,62±0,53	1,48±0,1	0,74±0,05
β-1,4-glucanasa	4,18±0,29	5,57±0,38	1,006±0,07	0,86±0,06
Celobiohidrolasa	2,75±0,19	2,76±0,19	1,19±0,08	1,17±0,08

Los niveles de significancia para las diferencias con el control fueron determinados por el test de Tukey. n.d.: no detectado.

Actividades lipasa y esterasa

En alpeorujos incubados con hongos saprobios se detectó actividad lipasa y al igual que sucede con otras actividades hidrolíticas, los niveles de dicha actividad aumentaron con el tiempo de incubación (Fig. 2). El alpeorujos incubados durante 2 semanas con los hongos *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium* y *Py. cinnabarinus* no mostraron actividad lipasa detectable. Podemos destacar según los resultados obtenidos, la existencia de dos grupos de hongos de comportamiento diferente en cuanto a la actividad lipasa se refiere, así la incubación con los hongos *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium* y *Py. cinnabarinus* mostraron valores bajos de actividad lipasa, mientras que los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus* y *Pl. pulmonarius*, tras su incubación durante 20 semanas, dieron valores altos llegando a 200 UI/g alpeorujos (Fig. 2).

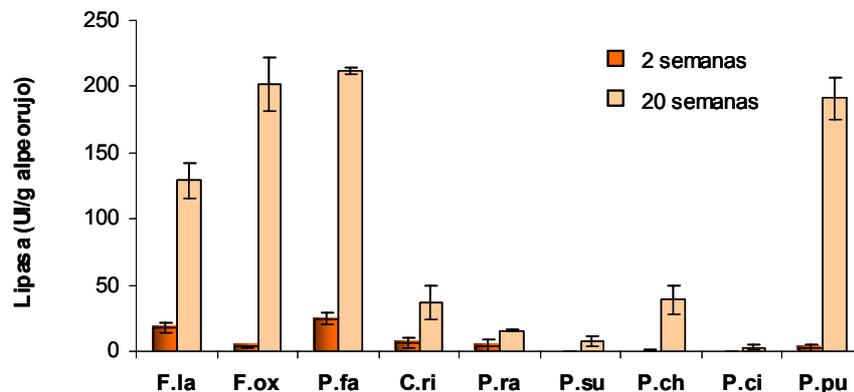


Fig. 2. Actividad lipasa detectada en alpeorujos inoculados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Las barras en cada columna indican el error estándar.

Al igual que sucedió con la actividad lipasa, se observó actividad esterasa en las muestras de alpeorujos incubadas con los diferentes hongos saprobios. El comportamiento de la actividad esterasa fue similar al de la actividad lipasa. Aunque los niveles de producción de este enzima fueron variables, se pudo observar distinto

comportamiento entre dos grupos de hongos. La incubación con los hongos *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Pha. chrysosporium* y *Py. cinnabarinus*, mostró valores muy bajos de actividad. Los hongos que dieron lugar a un aumento considerable de actividad esterasa fueron *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pl. pulmonarius* y *Pa. farinosus*, que al igual que sucedió en el caso de la actividad lipasa, alcanzaron valores cercanos a 200 UI/g alpeorujó (Fig. 3).

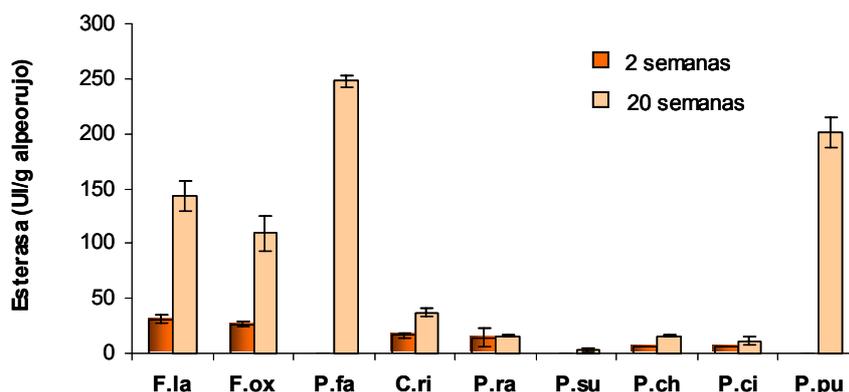


Fig. 3. Actividad esterasa detectada en alpeorujó inoculado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispóra* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Las barras en cada columna indican el error estándar.

3.4.2. Enzimas ligninolíticas

Actividad manganeso peroxidasa

En todos los casos estudiados, los niveles de actividad manganeso peroxidasa fueron muy bajos mostrándose además una disminución acusada de esta actividad enzimática al aumentar el tiempo de incubación de 2 a 20 semanas en todos los hongos ensayados, excepto en el caso de *Pa. farinosus* y como se puede observar en la Fig. 4, los mayores niveles de producción de manganeso peroxidasa se obtuvieron tras la incubación de alpeorujó 2 semanas con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispóra*, *Pha. chrysosporium* y *Py. cinnabarinus*.

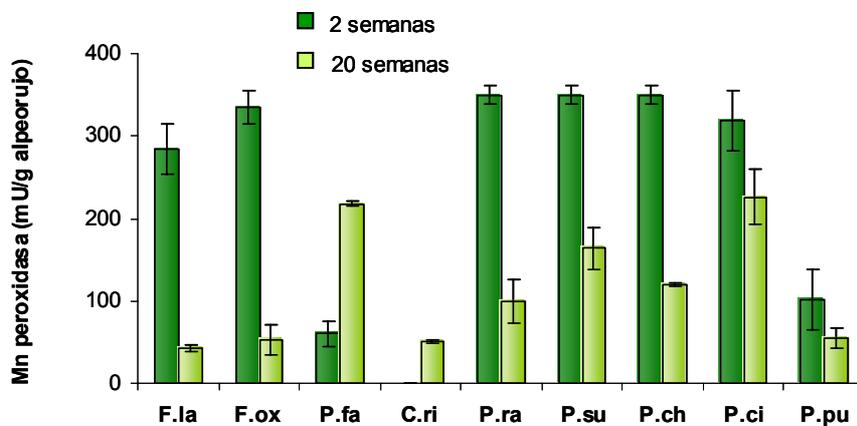


Fig. 4. Actividad manganeso peroxidasa detectada en alpeorjuo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispóra* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Las barras en cada columna indican el error estándar.

Actividad aril-alcohol oxidasa

No se detectó actividad aril-alcohol oxidasa en muestras de alpeorjuo incubado con los diferentes hongos saprobios ensayados.

Actividad lacasa

En alpeorjuo incubado con hongos saprobios no se detectó actividad lacasa en la mayoría de los casos estudiados. La incubación del alpeorjuo con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum* y *Pl. pulmonarius* mostró valores muy bajos de actividad así como la eliminación de ésta al aumentar el tiempo de incubación de 2 a 20 semanas. Los mayores niveles de producción de lacasa se obtuvieron tras la incubación de alpeorjuo 20 semanas con los hongos *C. rígida* y *Py. cinnabarinus* (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad lacasa detectada en alpeorujo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Alpeorujo incubado	
	2 semanas	20 semanas
	mUI (g alpeorujo) ⁻¹	mUI (g alpeorujo) ⁻¹
<i>F. lateritium</i>	25a	n.d.
<i>F. oxysporum</i>	42a	n.d.
<i>Pa. farinosus</i>	n.d.	n.d.
<i>C. rigida</i>	7,61a	957,5d
<i>Ph. radiata</i>	n.d.	n.d.
<i>Po. subvermispora</i>	n.d.	17,35a
<i>Pha. chrysosporium</i>	n.d.	n.d.
<i>Py. cinnabarinus</i>	n.d.	151,6c
<i>Pl. pulmonarius</i>	8,8a	n.d.

Valores seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Duncan (P=0,05).n.d.: no detectado.

Actividades fosfatasa y β -glucosidasa

La actividad fosfatasa de muestras de alpeorujos incubadas durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios fue similar a los controles, excepto en el caso de *C. rigida* y *Ph. radiata* que mostraron valores levemente superiores al obtenido en el alpeorujos control (Fig. 5).

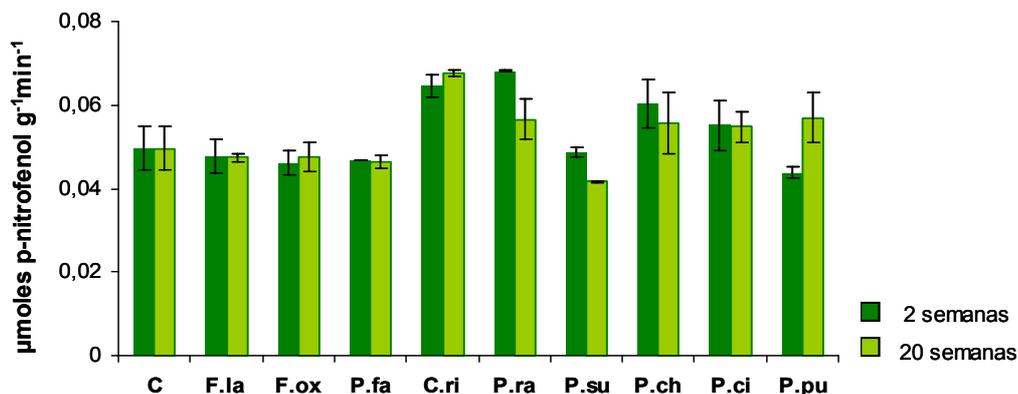


Fig. 5. Actividad fosfatasa detectada en alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Las barras en cada columna indican el error estándar.

El alpeorujos control mostró actividad β -glucosidasa, la cual no se modificaría en gran medida tras la incubación durante 2 o 20 semanas con los hongos saprobios ensayados. La incubación del alpeorujos con los hongos *F. oxysporum*, *Ph. radiata* y *Pha. chrysosporium* aumentaron levemente los niveles de dicha actividad (Fig. 6).

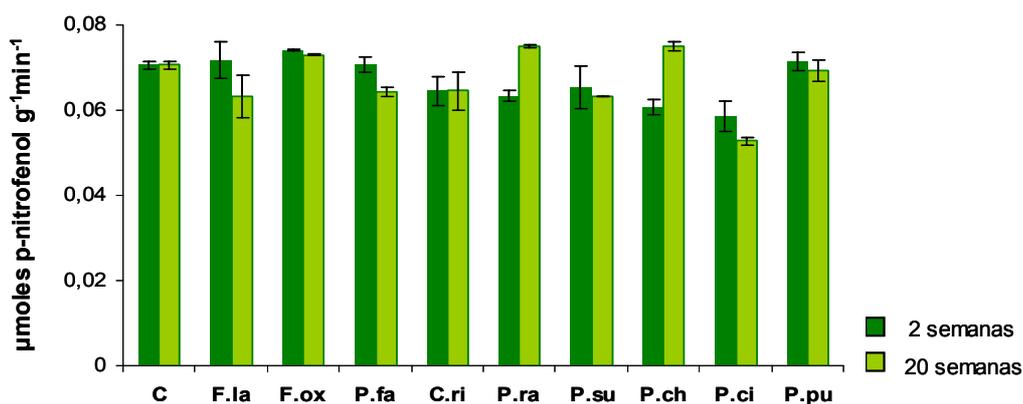


Fig. 6. Actividad β -glucosidasa detectada en alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Las barras en cada columna indican el error estándar.

3.5. Efecto del uso del alpeorujó transformado por hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas inoculadas o no inoculadas con hongos arbusculares o *Rhizobium*

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con cuatro factores de variación. Los factores fueron suelo no estéril, suelo estéril, suelo estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* y suelo estéril inoculado con *S. meliloti* GR4. Cada factor se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera, el factor inoculación del alpeorujó con hongos saprobios, que contenía once tratamientos: plantas sin alpeorujó (C), con alpeorujó no inoculado (O) y plantas con alpeorujó incubado con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*. La segunda variable consistió en el tiempo de incubación con los hongos saprobios: 2 y 20 semanas. Estos experimentos se realizaron en plantas de tomate y alfalfa con cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Se utilizaron semillas de tomate y alfalfa esterilizadas en superficie y pregerminadas en la mezcla suelo:arena:turba:vermiculita en la proporción de 1:1:1:1 (v:v). Las plantas se cultivaron en macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla de suelo estéril o no estéril mezclado con arena en la proporción 2:3 (v/v) a las que se reinoculó con un filtrado de suelo. Se cultivó una plántula por maceta. El alpeorujó seco y extractado incubado o no con los hongos saprobios durante 2, 10 y 20 semanas previamente esterilizado se añadió a las diferentes plantas a concentraciones de 0 y 60 g/kg. En los tratamientos micorrizados se añadieron al sustrato 8 g por maceta del inóculo de *G. deserticola*. En los tratamientos con *Rhizobium* se añadió 1 ml del cultivo bacteriano de *S. meliloti* GR4 de manera homogénea directamente a las plántulas de alfalfa con una población bacteriana de 10^6 cel/ml. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en el invernadero. Semanalmente se aplicó 10 ml de la solución de Long Asthon con 0,5 gr/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a las plantas no micorrizadas. Las plantas micorrizadas se fertilizaron con la misma solución nutritiva sin fósforo y las inoculadas con *Rhizobium* con la solución libre de N.

Determinaciones

Las plantas crecieron en el invernadero bajo condiciones controladas y se cosecharon después de 30 días. Una vez cosechadas, se determinó el peso seco de la parte aérea y de raíz tras secar las plantas a 70°C durante 48 h y el contenido de N, P y K en sus tejidos (Mingorance, 2002). Para la determinación de la colonización MA se procedió a la tinción de raíces según lo descrito por Phillips y Hayman (1970). El porcentaje de longitud de raíz micorrizada se estimó utilizando la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980).

Resultados

Los resultados obtenidos muestran que la adición de 60 g/Kg de alpeorujos seco y extractado no incubado con hongos saprobios a plantas de tomate, produjo una disminución del peso seco de parte aérea y de raíz (Fig. 1 y 2).

La fitotoxicidad del alpeorujos no se vio prácticamente afectada por la incubación con hongos saprobios durante 2 semanas en los tres tratamientos aplicados, suelo no estéril, suelo estéril y suelo estéril con micorriza. La inoculación de alpeorujos con los distintos hongos saprobios durante 2 semanas añadido a plantas de tomate crecidas en suelo estéril tuvo un comportamiento similar al de plantas crecidas en suelo no estéril, en las que el peso seco de parte aérea de plantas de tomate crecidas en general no se modificó o lo hizo levemente. Fue necesario la incubación del alpeorujos durante 20 semanas para disminuir la fitotoxicidad del alpeorujos sobre plantas de tomate crecidas. Para dicho tiempo de incubación, se observó para el tratamiento de suelo no estéril, una disminución generalizada de la fitotoxicidad, exceptuando tres hongos, *Pha. chryso sporium*, *Pl. pulmonarius* y *Py. cinnabarinus*; analizando el tratamiento de suelo estéril, se observa una mejora en la disminución del efecto fitotóxico con respecto al tratamiento anterior, sobre todo en aquellos hongos menos efectivos en el descenso de los niveles de fitotoxicidad. La inoculación con el hongo arbuscular *G. deserticola* ocasionó incrementos generalizados en el peso seco de parte aérea y raíz de plantas de tomate control sin alpeorujos (Fig. 1 y 2). El tratamiento más efectivo de todos los ensayados fue el realizado con micorriza, ya que en dicho tratamiento, la incubación del alpeorujos con los hongos saprobios supuso en la mayoría de los casos, un desarrollo de las plantas superior al de plantas sin alpeorujos o control, mostrando los hongos *Pa. farinosus* y *Po. subvermispora* los mayores valores de peso seco de parte aérea y de raíz. Por otro lado, cabe destacar que en plantas a las que se adicionó alpeorujos sin incubar, la micorriza no tuvo ningún efecto beneficioso (Fig. 1).

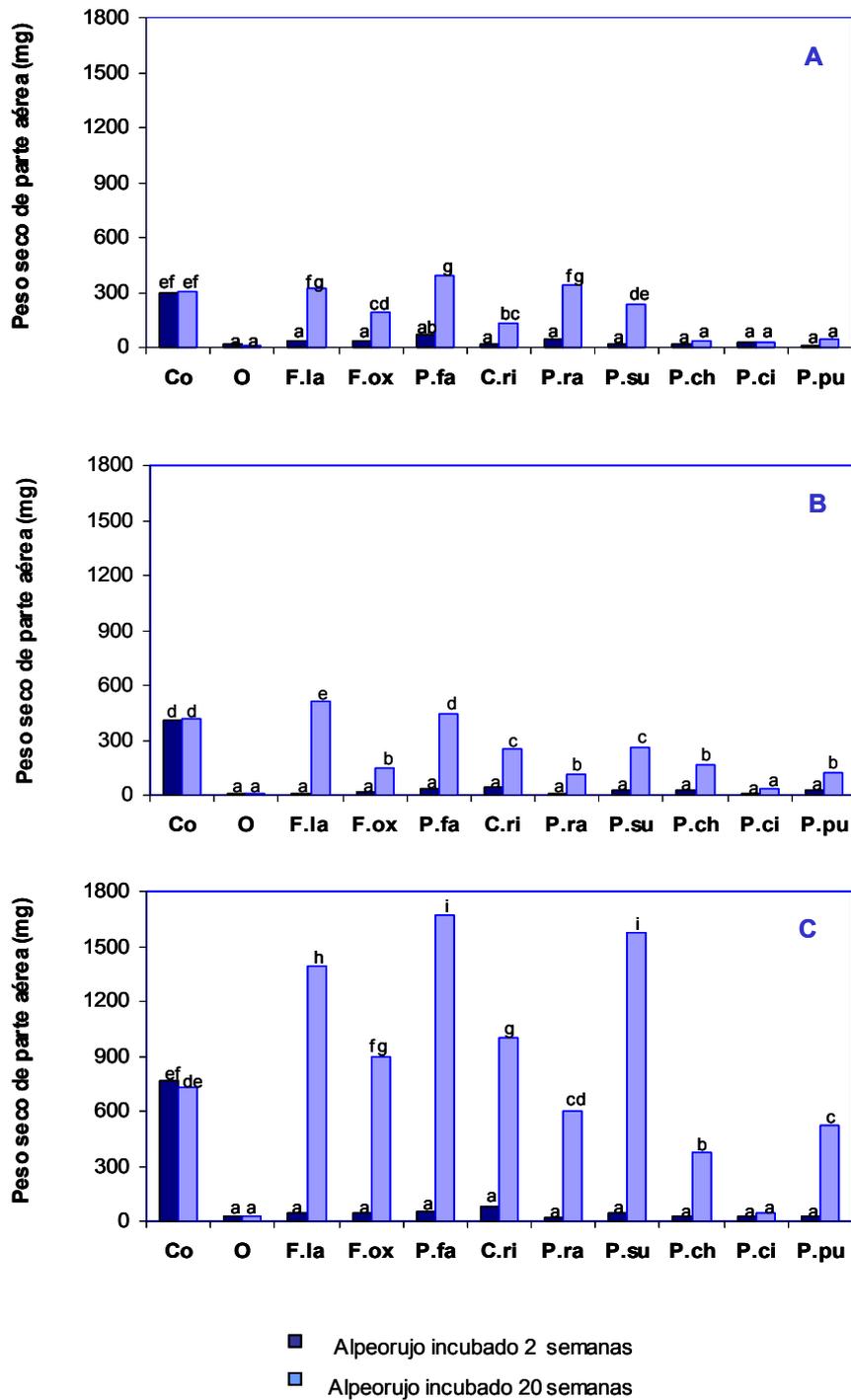


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) crecidas en suelo no estéril (A), estéril (B) y estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* (C), sin alpeorajo (Co), con alpeorajo seco y extractado no inoculado (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorajo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P. fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's P=0,05).

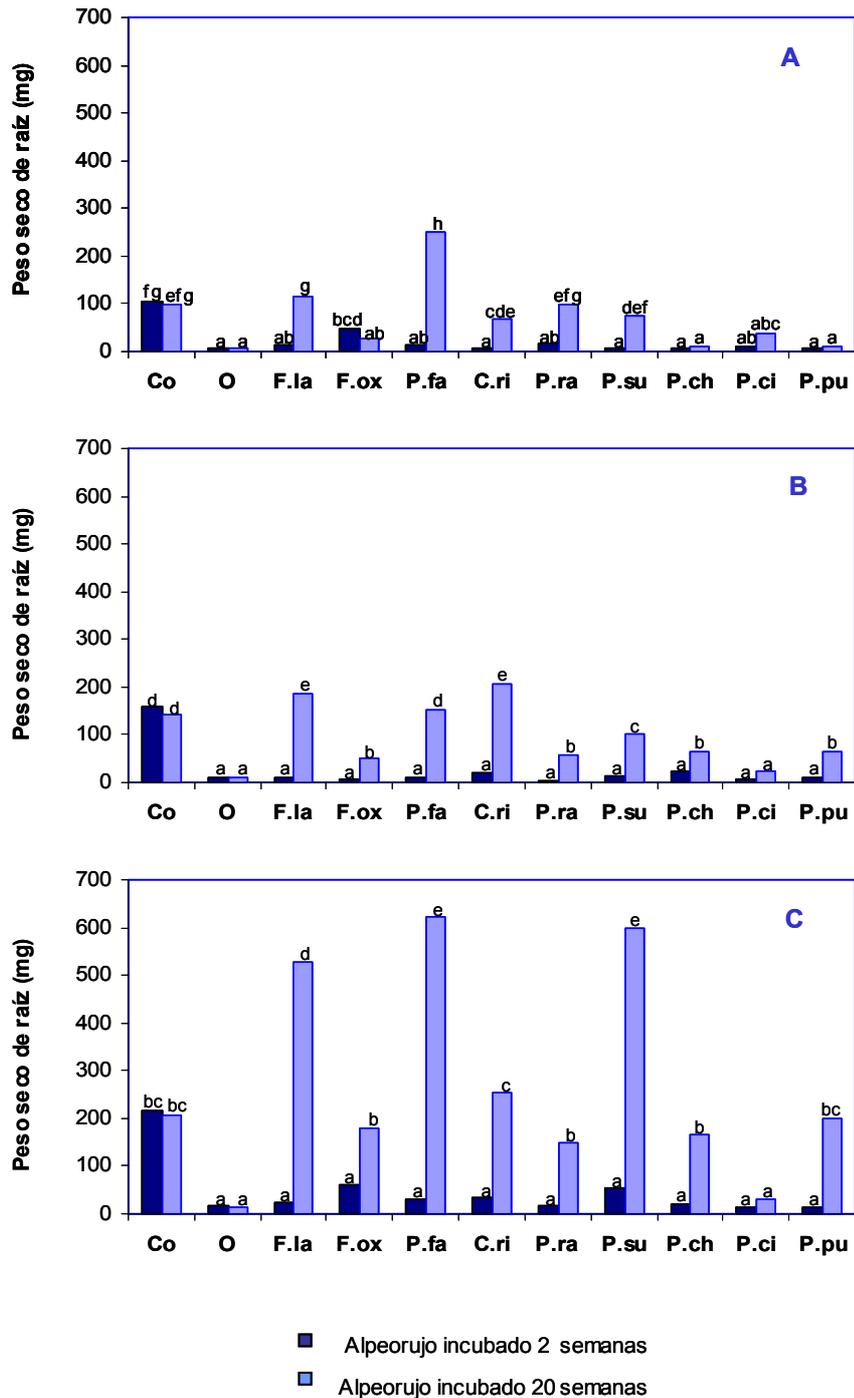


Fig. 2. Peso seco de la raíz de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas en suelo no estéril (A), estéril (B) y estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* (C), sin alpeorujos (Co), con alpeorujos seco y extractado no inoculado (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P. fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chryso sporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's P=0,05).

Los efectos fitotóxicos del alpeorujó también se estudiaron en plantas de alfalfa, utilizando similares tratamientos que los realizados en plantas de tomate, considerando además la inoculación de la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4. Los resultados obtenidos muestran que la adición de 60 g/Kg de alpeorujó seco y extractado no incubado con hongos saprobios a plantas de alfalfa, produjo una disminución del peso seco de parte aérea y de raíz (Fig. 3 y 4).

Los resultados obtenidos en este tipo de planta fueron muy similares a los obtenidos en plantas de tomate en cuanto a resultados comparativos entre tratamientos se refiere, aunque hay que señalar que el tratamiento con micorriza es menos efectivo. La fitotoxicidad del alpeorujó no se vio prácticamente afectada por la incubación con hongos saprobios durante 2 semanas en todos los tratamientos aplicados. La inoculación de alpeorujó con los distintos hongos saprobios durante 2 semanas añadido a plantas de alfalfa crecidas en suelo estéril tuvo un comportamiento similar al de plantas crecidas en suelo no estéril, en las que el peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa, en general no se modificó o lo hizo levemente. Para tiempos de incubación de 20 semanas, se observó en la mayoría de los tratamientos y de los hongos una disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó sobre plantas de alfalfa crecidas. El tratamiento de suelo no estéril mostró una disminución generalizada de la fitotoxicidad, exceptuando tres hongos *F. lateritium*, *Ph. radiata* y *Py. cinnabarinus*; analizando el tratamiento de suelo estéril, se observa una mejora en la disminución del efecto fitotóxico con respecto al tratamiento anterior, sobre todo en aquellos hongos menos efectivos en el descenso de los niveles de fitotoxicidad, así como la obtención de los valores más altos de peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa en la incubación del alpeorujó con los hongos *C. rígida* y *Pl. pulmonarius* (Fig. 3). Los tratamientos con micorriza y bacteria proporcionaron un efecto beneficioso en la mejora de la fitotoxicidad del alpeorujó en plantas de alfalfa, así la incubación del alpeorujó con los hongos saprobios supuso en la mayoría de los casos, un desarrollo de las plantas superior al de plantas sin alpeorujó o control. Podríamos destacar como diferencia principal entre ambos tratamientos, el menor desarrollo de la biomasa vegetal obtenido en la inoculación con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4.

El alpeorujó modificó en general de la misma forma el peso de la parte aérea y de raíz de plantas de alfalfa (Fig. 3 y 4). Cuando se inoculó el residuo con *Py. cinnabarinus* aportó mayores incrementos que los observados en parte aérea de alfalfa.

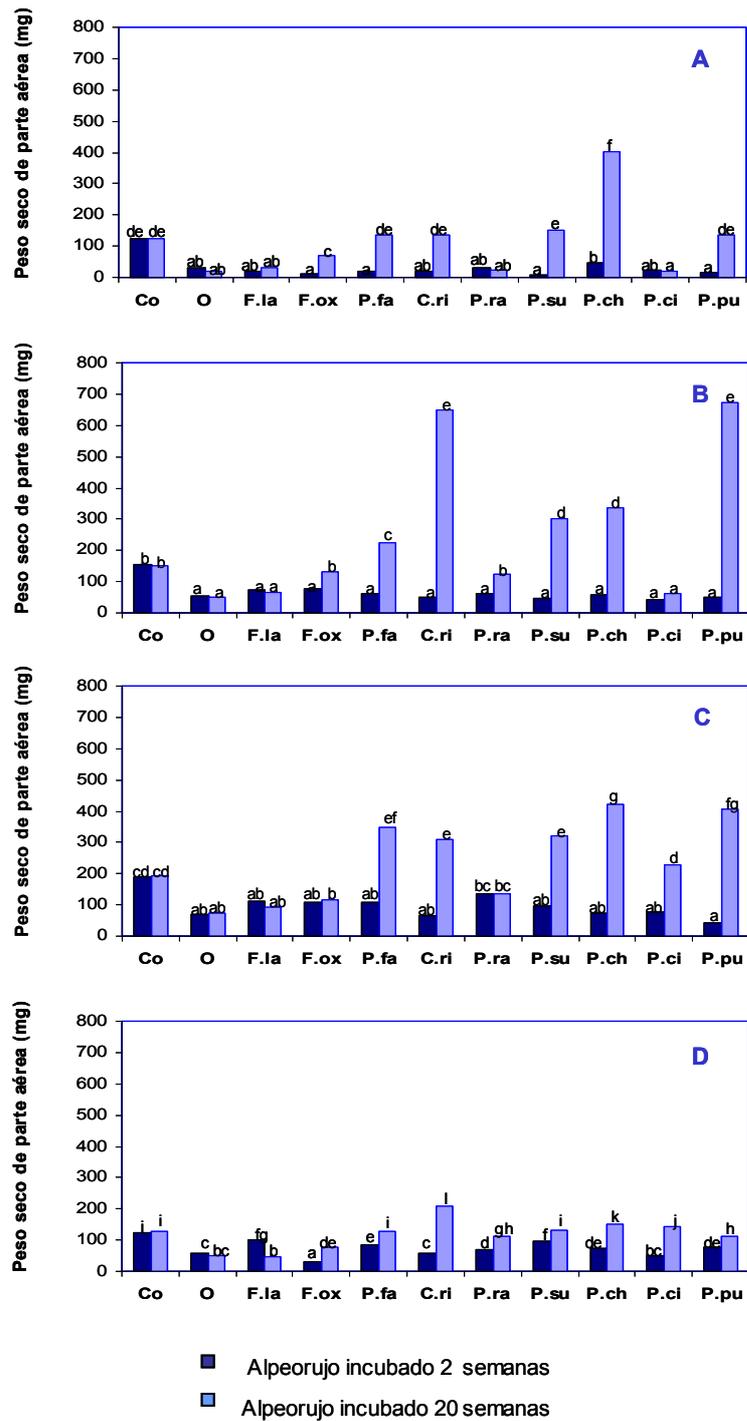


Fig. 3. Peso seco de la parte aérea de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas en suelo no estéril (A), estéril (B), estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* (C), estéril inoculado con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4 (D), sin alpeorujos (Co) y con alpeorujos secos y extractados no inoculados (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P. fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermisporea* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's $P=0,05$).

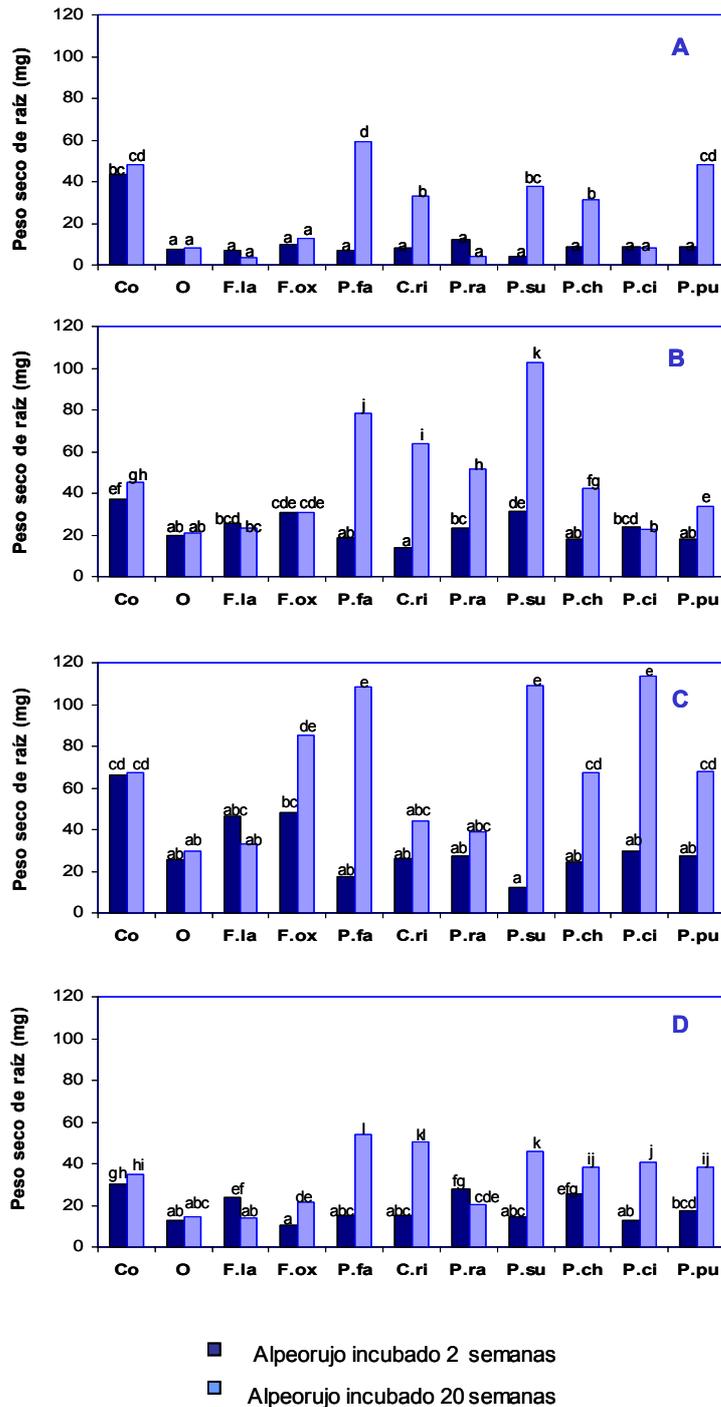


Fig. 4. Peso seco de la raíz de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas en suelo no estéril (A), estéril (B), estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* (C), estéril inoculado con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4 (D), sin alpeorujos (Co) y con alpeorujos secos y extractados no inoculados (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P. fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermisporea* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's P=0,05).

Los estudios de longitud de raíz colonizada en plantas de tomate mostraron similitudes entre los tratamientos con suelo estéril y suelo estéril inoculado con *G. deserticola* en incubaciones del alpeorujito durante 2 semanas con los hongos saprobios, en las que la longitud de raíz colonizada no se modificó o lo hizo levemente, salvo en el tratamiento con suelo estéril en el que los hongos *Pa. farinosus*, *Po. subvermispora* y *Py. cinnabarinus* aumentaron la micorrización con respecto a plantas a las que se adicionó alpeorujito sin tratar (Fig. 5). Sin embargo, para el tiempo de incubación de 20 semanas, hay diferencias notables entre ambos tratamientos. Así, los niveles de micorrización no se modificaron en la mayoría de las incubaciones ensayadas en el tratamiento con suelo estéril mientras que el realizado con suelo estéril inoculado con *G. deserticola* supuso un aumento notable de los niveles de micorrización llegando a alcanzar valores similares a los obtenidos en plantas a las que no se adicionó alpeorujito (Fig. 5). El estudio de la longitud de raíz colonizada en tratamientos en los que se había adicionado micorriza exógena, mostró una variabilidad enorme para el tiempo de incubación de dos semanas según el tipo de hongo, destacando, sin embargo la linealidad de resultados para el tiempo de incubación de veinte semanas en todos los hongos estudiados, siendo estos niveles superiores a los detectados en el tiempo de incubación de dos semanas.

A diferencia de lo observado en plantas de tomate, las modificaciones de los niveles de micorrización en plantas de alfalfa fueron muy similares tanto en los tratamientos con suelo estéril y suelo estéril con *G. deserticola* como en los dos tiempos de incubación estudiados (Fig. 6). El estudio de la longitud de raíz colonizada mostró en la mayoría de los casos valores superiores de micorrización de los hongos MA indígenas para el tiempo de incubación de veinte semanas. En el caso de micorrizas exógenas, se observaron valores similares de micorrización al que presentaban las micorrizas indígenas (Fig. 6).

Los resultados obtenidos muestran comportamientos similares de los dos tipos de plantas a la adición de alpeorujito sin incubar en los diferentes tratamientos realizados, así como un desarrollo de la micorriza similar atenuado o no por el efecto fitotóxico del alpeorujito.

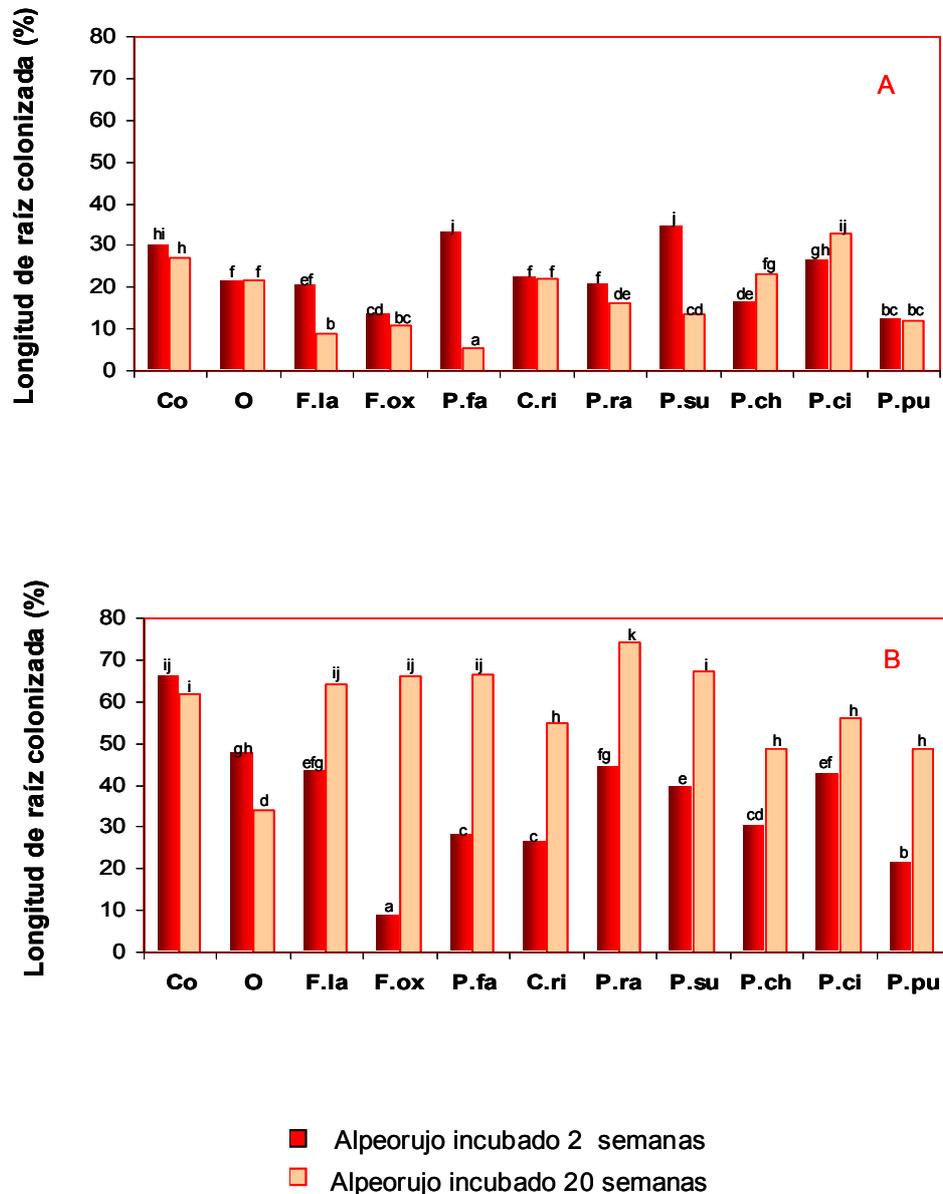


Fig. 5. Longitud de raíz colonizada en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas en suelo estéril (A) y estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* (B), sin alpeorujos (Co), con alpeorujos seco y extractado no inoculado (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P. fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's P=0,05).

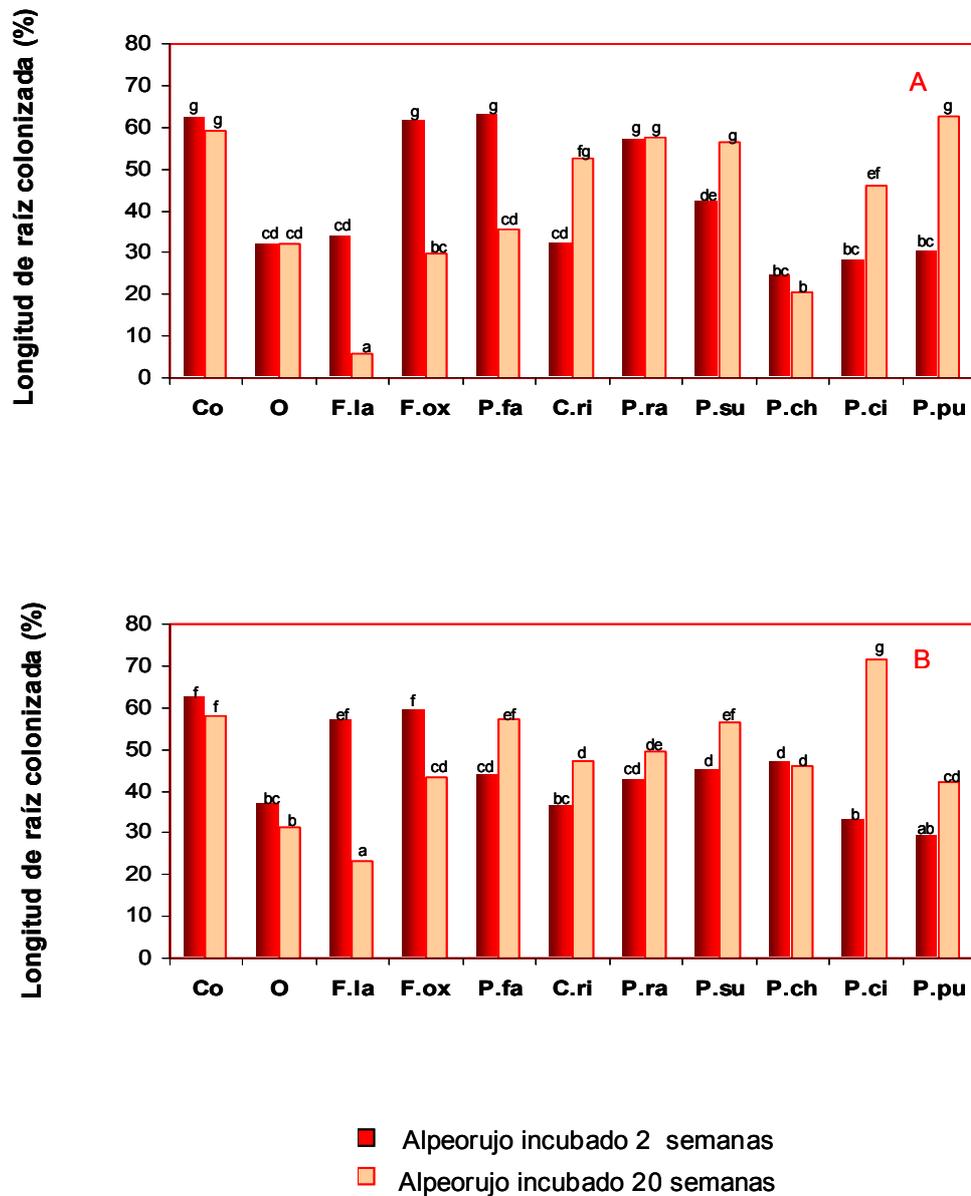


Fig. 6. Longitud de raíz colonizada en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas en suelo estéril (A) y estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* (B), sin alpeorujos (Co) y con alpeorujos seco y extractado no inoculado (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P. fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra), *Po. subvermispora* (P.su), *Pha. chrysosporium* (P.ch), *Py. cinnabarinus* (P.ci) y *Pl. pulmonarius* (P.pu). Letras distintas en cada tratamiento denotan diferencias significativas (Duncan's $P=0,05$).

Concentración de nitrógeno, potasio y fósforo en plantas de tomate

Los niveles de nitrógeno de la parte aérea de plantas de tomate disminuyeron al añadir alpeorujos no inoculados siendo esta disminución menos acusada cuando se añadió alpeorujos incubados con el hongo *C. rigida*, exceptuando los tratamientos con suelo estéril inoculado con *G. deserticola* y alpeorujos incubados 2 semanas, así como suelo no estéril y alpeorujos incubados 20 semanas, en los que la incubación con el hongo *C. rigida* dio lugar a niveles de nitrógeno superiores a los de plantas de tomate sin alpeorujos (Tabla 1). Las mayores cantidades de nitrógeno para ambos tiempos de incubación se obtuvieron con el tratamiento de suelo no estéril (Tabla 1).

Respecto al contenido de potasio, y al contrario de lo observado con el nitrógeno, al añadir alpeorujos no inoculados a plantas de tomate se produjo un aumento de los niveles de potasio de la parte aérea. La inoculación del alpeorujos con el hongo *C. rigida* supuso el aumento de dicho macronutriente respecto a plantas a las que no se añadió alpeorujos. Las mayores cantidades de potasio para ambos tiempos de incubación se obtuvieron cuando se añadió a las plantas alpeorujos sin inocular, concretamente en el tratamiento de suelo estéril con micorriza para el tiempo de incubación de 2 semanas y el tratamiento de suelo estéril para el tiempo de incubación de 20 semanas (Tabla 1).

Los niveles de fósforo se modificaron de distinta manera dependiendo de los tiempos de incubación del alpeorujos. Así, cuando se incubó durante 2 semanas, dichos niveles disminuyeron con el alpeorujos no inoculado y aumentaron al añadir alpeorujos inoculados con el hongo *C. rigida*. Sin embargo, cuando se incubó durante 20 semanas, la cantidad de fósforo aumentó tanto al añadir alpeorujos no inoculados como alpeorujos incubados, obteniéndose los mayores aumentos en el primer caso (Tabla 1). Los valores mayores de fósforo se obtuvieron con el tratamiento de suelo no estéril al igual que se observó con el nitrógeno.

Tabla 1. Concentración de nitrógeno, potasio y fósforo de la parte aérea de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) crecidas en suelo no estéril, estéril y estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola*, sin alpeorujos (0% Alp.), con alpeorujos secos y extractados no inoculados (5% Alp.) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con el hongo saprobio *C. rigida*.

Tratamiento	Tiempo de incubación					
	2 semanas			20 semanas		
	0% Alp.	5% Alp.	5% Alp. + <i>C. rigida</i>	0% Alp.	5% Alp.	5% Alp. + <i>C. rigida</i>
Concentración de N (g/Kg)						
Suelo no estéril	47,05e	32,12bc	37bcde	40,4cde	37,25bcde	46,55e
Suelo estéril	30,45bc	22,95ab	25,7ab	47,1e	45,85de	42,35cde
Suelo estéril + Micorriza	27,35b	19,43a	33,4bcd	41,1cde	40,35e	39,05bcde
Concentración de K (g/Kg)						
Suelo no estéril	37,05cd	38cd	41,5de	27,15a	39,7cde	47,35e
Suelo estéril	35,5bc	39,07cd	45de	17,65a	56,35f	37,7bc
Suelo estéril + Micorriza	33,35abc	46,18de	37,4bc	30ab	45,8de	39,2cd
Concentración de P (g/Kg)						
Suelo no estéril	1,9ab	1,52a	3,75cd	2,45bc	4,75d	3,3c
Suelo estéril	2,4bc	2,34bc	3,45cd	2,45bc	2,5bc	3,55cd
Suelo estéril + Micorriza	2,2b	1,36a	3,05c	2,05ab	3,65cd	3,2c

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

Concentración de nitrógeno, potasio y fósforo en plantas de alfalfa

Los niveles de nitrógeno de la parte aérea de plantas de alfalfa disminuyeron al añadir alpeorujos no inoculados siendo esta disminución más acusada cuando se añadió alpeorujos incubados con el hongo *C. rigida* exceptuando los tratamientos con suelo no estéril y suelo estéril inoculado con *S. meliloti* para el tiempo de incubación de 20 semanas (Tabla 2). Las mayores cantidades de nitrógeno se obtuvieron con los tratamientos de suelo estéril con micorriza y con *S. meliloti* en los que el tiempo de incubación del alpeorujos fue de 20 semanas (Tabla 2).

Respecto al contenido de potasio, y al contrario de lo observado con el nitrógeno y tal como ocurría en plantas de tomate, al añadir alpeorujos no inoculados a plantas de alfalfa se produjo un aumento de los niveles de potasio de la parte aérea. La inoculación del alpeorujos con el hongo *C. rigida* supuso el aumento de dicho macronutriente respecto a plantas a las que no se añadió alpeorujos, siendo el aumento más significativo cuando el tiempo de incubación de dicho hongo fue de 20 semanas y cuando el tratamiento fue suelo no estéril (Tabla 2).

Los niveles de fósforo se modificaron de distinta manera dependiendo de los tiempos de incubación del alpeorujos. Así, cuando se incubó durante 2 semanas, dichos niveles disminuyeron al añadir tanto alpeorujos no inoculados como alpeorujos inoculados con el hongo *C. rigida*. Sin embargo, cuando se incubó durante 20 semanas, la cantidad de fósforo aumentó al añadir alpeorujos sin inocular y disminuyó con el alpeorujos incubado con *C. rigida*. Los valores mayores de fósforo se obtuvieron con el tratamiento de suelo no estéril al igual que se observó con el potasio (Tabla 2).

Cabe destacar ciertas similitudes y diferencias de los resultados de macronutrientes obtenidos en la parte aérea de plantas de tomate y alfalfa, así al añadir alpeorujos no inoculados se produjo un descenso generalizado en el contenido de nitrógeno para ambas plantas. La inoculación del alpeorujos con *C. rigida* supuso que no disminuyeran los niveles de nitrógeno sino que aumentarían, efecto sólo observado en plantas de tomate. Respecto a los niveles de potasio se observó en ambas plantas un aumento del mismo al añadir alpeorujos no inoculados, obteniéndose un mayor aumento cuando el alpeorujos se incubó con *C. rigida*. Los resultados de la concentración de fósforo en ambas plantas mostraron una gran variabilidad en los diferentes tiempos de incubación en ambas plantas.

Tabla 2. Concentración de nitrógeno, potasio y fósforo de la parte aérea de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas en suelo no estéril, estéril, estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola*, estéril inoculado con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4, sin alpeorujo (0% Alp.), con alpeorujo seco y extractado no inoculado (5%Alp.) y en presencia de alpeorujo incubado durante 2 y 20 semanas con el hongo saprobio *C. rigida*.

Tratamiento	Tiempo de incubación					
	2 semanas			20 semanas		
	0% Alp.	5% Alp.	5% Alp. + <i>C. rigida</i>	0% Alp.	5% Alp.	5% Alp. + <i>C. rigida</i>
Concentración de N (g/Kg)						
Suelo no estéril	54,7f	37,35abcd	30,25a	48def	42,1abcde	46,75cdef
Suelo estéril	53,4ef	40,25abcde	30,4a	69,3g	51ef	46bcdef
Suelo estéril + Micorriza	51,5ef	36,6abcd	32,7ab	64,2fg	56,5f	43,45abcdef
Suelo estéril + <i>S. meliloti</i>	49,4def	35,65abc	30,1a	62,1fg	49,1def	51,65ef
Concentración de K (g/Kg)						
Suelo no estéril	33,7bcd	34bcd	33bcd	24,3ab	31bcd	39,1d
Suelo estéril	31,8bcd	35cd	34bcd	18,2a	42de	37,05cd
Suelo estéril + Micorriza	23ab	31,85bcd	28,55abc	21a	30bcd	33,35bcd
Suelo estéril + <i>S. meliloti</i>	28abc	31,05bcd	28,2abc	24ab	29,75bcd	32,75bcd
Concentración de P (g/Kg)						
Suelo no estéril	3,25cd	2,6bc	1,75ab	3,75d	5,2e	2,5abc
Suelo estéril	2,55bc	2,6bc	2,3abc	2,6bc	2,7bc	2,35abc
Suelo estéril + Micorriza	3,7d	2,3abc	2,75c	3,5cd	4,3d	3,25cd
Suelo estéril + <i>S. meliloti</i>	2,6bc	1,55a	2,5abc	2,5abc	3,5cd	2,45abc

Valores de cada uno de los parámetros estudiados seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de rango múltiple de Tukey HSD ($P \leq 0,05$).

3.6. Evaluación del impacto del alpeorujo transformado sobre la microflora total del suelo

Material y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con cuatro factores de variación. Los factores fueron suelo no estéril, suelo estéril, suelo estéril inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* y suelo estéril inoculado con *S. meliloti* GR4. Cada factor se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera, el factor inoculación del alpeorujo con hongos saprobios, que contenía once tratamientos: plantas sin alpeorujo (C), con alpeorujo no inoculado (O) y plantas con alpeorujo incubado con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*. La segunda variable consistió en el tiempo de incubación con los hongos saprobios: 2 y 20 semanas. Estos experimentos se realizaron en plantas de tomate y alfalfa con cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Se utilizaron semillas de tomate y alfalfa esterilizadas en superficie y pregerminadas en la mezcla suelo:arena:turba:vermiculita en la proporción 1:1:1:1 (v:v). Las plantas se cultivaron en macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla de suelo estéril o no estéril mezclado con arena 1:1 (v/v) a las que se reinoculó con un filtrado de suelo. Se cultivó una plántula por maceta. El alpeorujo seco y extractado incubado o no con los hongos saprobios durante 2, 10 y 20 semanas previamente esterilizado se añadió a las diferentes plantas a concentraciones de 0 y 60 g/kg. En los tratamientos micorrizados se añadieron al sustrato 8 g por maceta del inóculo de *G. deserticola*. En los tratamientos con *Rhizobium* se añadió 1 ml del cultivo bacteriano de *S. meliloti* GR4 de manera homogénea directamente a las plántulas de alfalfa con una población bacteriana de 10^6 cel/ml. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas en el invernadero. Semanalmente se aplicó 10 ml de la solución de Long Asthon con 0,5 gr/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a las plantas no micorrizadas. Las plantas micorrizadas se fertilizaron con la misma solución nutritiva sin fósforo y las inoculadas con *Rhizobium* con la solución libre de N.

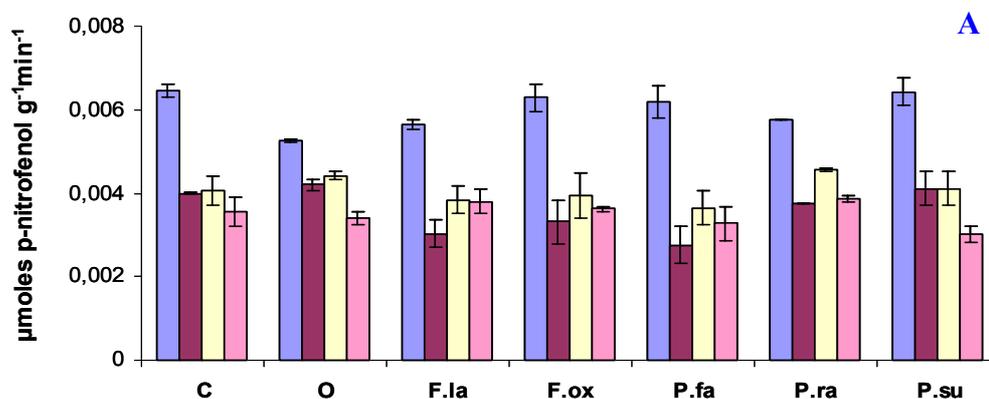
Determinaciones

Con el suelo rizosférico de cada tratamiento se cuantificó la población de microorganismos totales (bacterias y hongos) cultivables a lo tres veces a lo largo del experimento y se estudiaron las actividades enzimáticas del suelo mediante el estudio de las enzimas fosfatasa y β -glucosidasa. También se realizó una aproximación estructural de la heterogeneidad de la población bacteriana y fúngica del suelo mediante electroforesis del ADN bacteriano en gradiente de temperatura (TGGE).

Resultados

3.6.1. Actividades enzimáticas del suelo

La actividad fosfatasa del suelo en el que se crecieron plantas de tomate y de alfalfa, disminuyó en los tratamientos en los que se añadió alpeorajo sin inocular considerando el tiempo de incubación de 2 semanas. La incubación del alpeorajo con diferentes hongos saprobios incrementó los niveles de actividad fosfatasa respecto a los obtenidos con alpeorajo sin inocular, pero sólo en el suelo obtenido de plantas de tomate ya que en plantas de alfalfa en la mayoría de los casos, no se observó dicho incremento (Fig. 1). El alpeorajo incubado con los diferentes hongos saprobios durante 20 semanas añadido a plantas de tomate no modificó los niveles de actividad fosfatasa con respecto a plantas sin alpeorajo y con alpeorajo no inoculado. Sin embargo, si se observó un aumento de dicha actividad en plantas de alfalfa crecidas durante 20 días. El suelo obtenido en plantas de tomate y alfalfa crecidas durante 10 y 30 días no mostró ninguna modificación de actividad (Fig. 1).



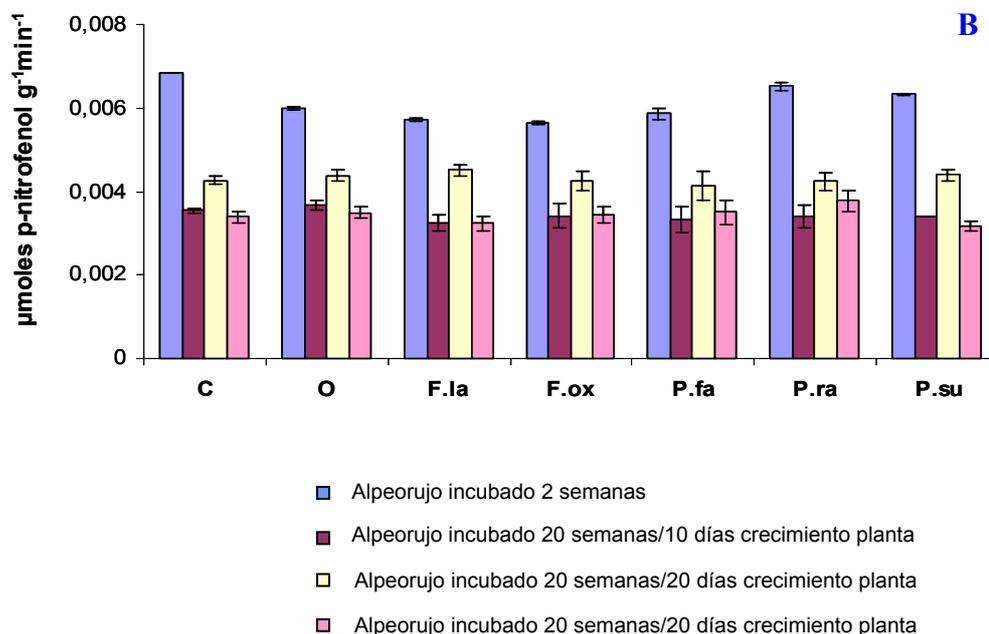


Fig. 1. Actividad fosfatasa detectada en suelo de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) (A) y plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (B) crecidas a diferentes tiempos, sin alpeorujos (C), con alpeorujos secos y extractados no inoculados (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra) y *Po. subvermisporea* (P.su). Las barras en cada columna indican el error estándar.

Los estudios de actividad fosfatasa de suelo de plantas de tomate crecidas durante 10 días mostraron un aumento de dicha actividad con respecto a la obtenida en suelo sin planta en los tratamientos con alpeorujos no inoculados y alpeorujos inoculados con los hongos *Ph. radiata* y *Po. subvermisporea*. Sin embargo, la actividad en suelos de plantas de alfalfa fue menor que en suelos sin planta (Fig. 2). En plantas crecidas durante 20 y 30 días no se observaron diferencias significativas de actividad fosfatasa entre los tratamientos con planta de tomate y alfalfa y los tratamientos sin planta.

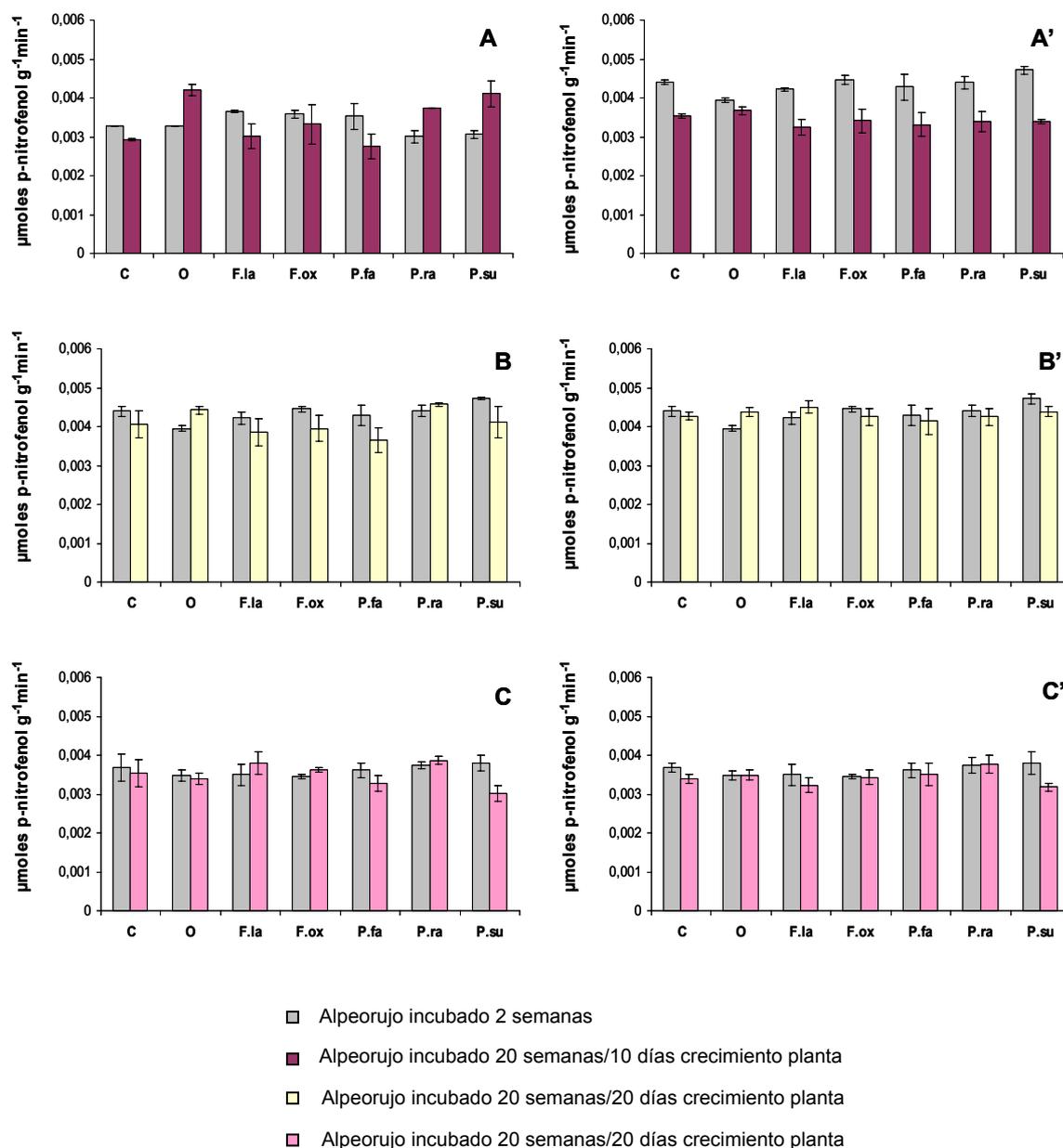
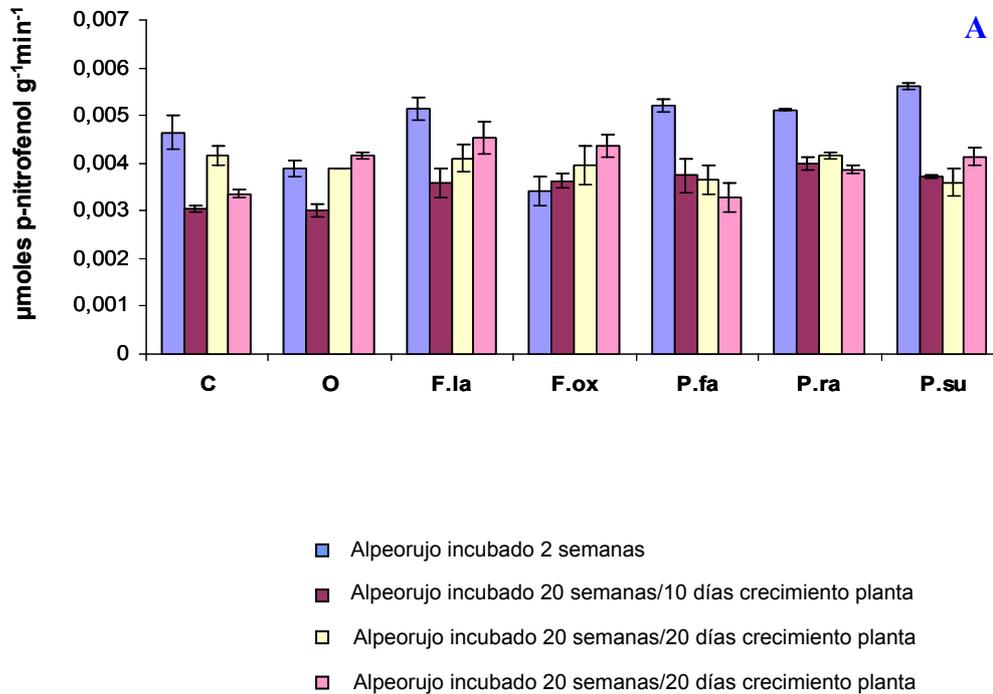


Fig. 2. Actividad fosfatasa detectada en suelo de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) (A, B, C) y plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (A', B', C') crecidas 10, 20 y 30 días, sin alpeorujos (C), con alpeorujos secos y extractados no inoculados (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra) y *Po. subvermispota* (P.su). Las barras en cada columna indican el error estándar.

La actividad β -glucosidasa del suelo en el que se crecieron plantas de tomate, disminuyó en los tratamientos en los que se añadió alpeorajo sin inocular considerando el tiempo de incubación de 2 semanas. La incubación del alpeorajo con diferentes hongos saprobios incrementó los niveles de actividad fosfatasa respecto a los obtenidos con alpeorajo sin inocular, (Fig. 3). Sin embargo en plantas de alfalfa, la actividad β -glucosidasa del suelo aumentó al añadir alpeorajo sin inocular obteniéndose leves modificaciones o valores inferiores con la incubación del alpeorajo con hongos saprobios. El alpeorajo incubado con los diferentes hongos saprobios durante 20 semanas añadido a plantas de tomate y alfalfa crecidas 10 días produjo leves modificaciones de los niveles de actividad β -glucosidasa con respecto a plantas sin alpeorajo y con alpeorajo no inoculado. Los suelos de plantas de tomate y alfalfa crecidas 20 y 30 días son los que mostraron mayores diferencias entre los tratamientos con alpeorajo inoculado o no con hongos saprobios y los tratamientos sin alpeorajo, observándose en la mayoría de los casos un leve aumento de los niveles de actividad β -glucosidasa (Fig. 3).



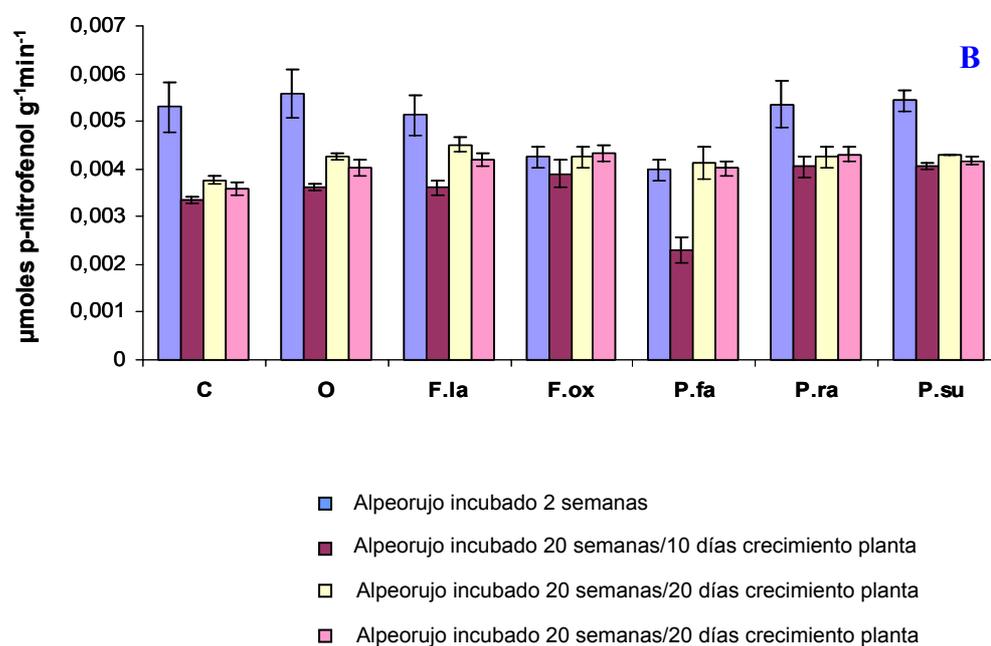


Fig. 3. Actividad β -glucosidasa detectada en suelo de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) (A) y plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (B) crecidas a diferentes tiempos, sin alperujo (C), con alperujo seco y extractado no inoculado (60 g/Kg) (O) y en presencia de alperujo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rigida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra) y *Po. subvermispora* (P.su). Las barras en cada columna indican el error estándar.

Los estudios de actividad β -glucosidasa de suelo de plantas de tomate y alfalfa crecidas durante 10 y 20 días mostraron un aumento de dicha actividad con respecto a la obtenida en suelo sin planta en los tratamientos con alperujo inoculado con los hongos *Ph. radiata* y *Po. subvermispora* no modificándose en prácticamente el resto de tratamientos los niveles de dicha actividad (Fig. 4). En plantas crecidas durante 30 días al añadir alperujo incubado o no con diferentes hongos saprobios provocó el aumento de la actividad β -glucosidasa. Para este tiempo de crecimiento no se observaron diferencias significativas de actividad β -glucosidasa entre los tratamientos con planta de tomate y alfalfa y los tratamientos sin planta.

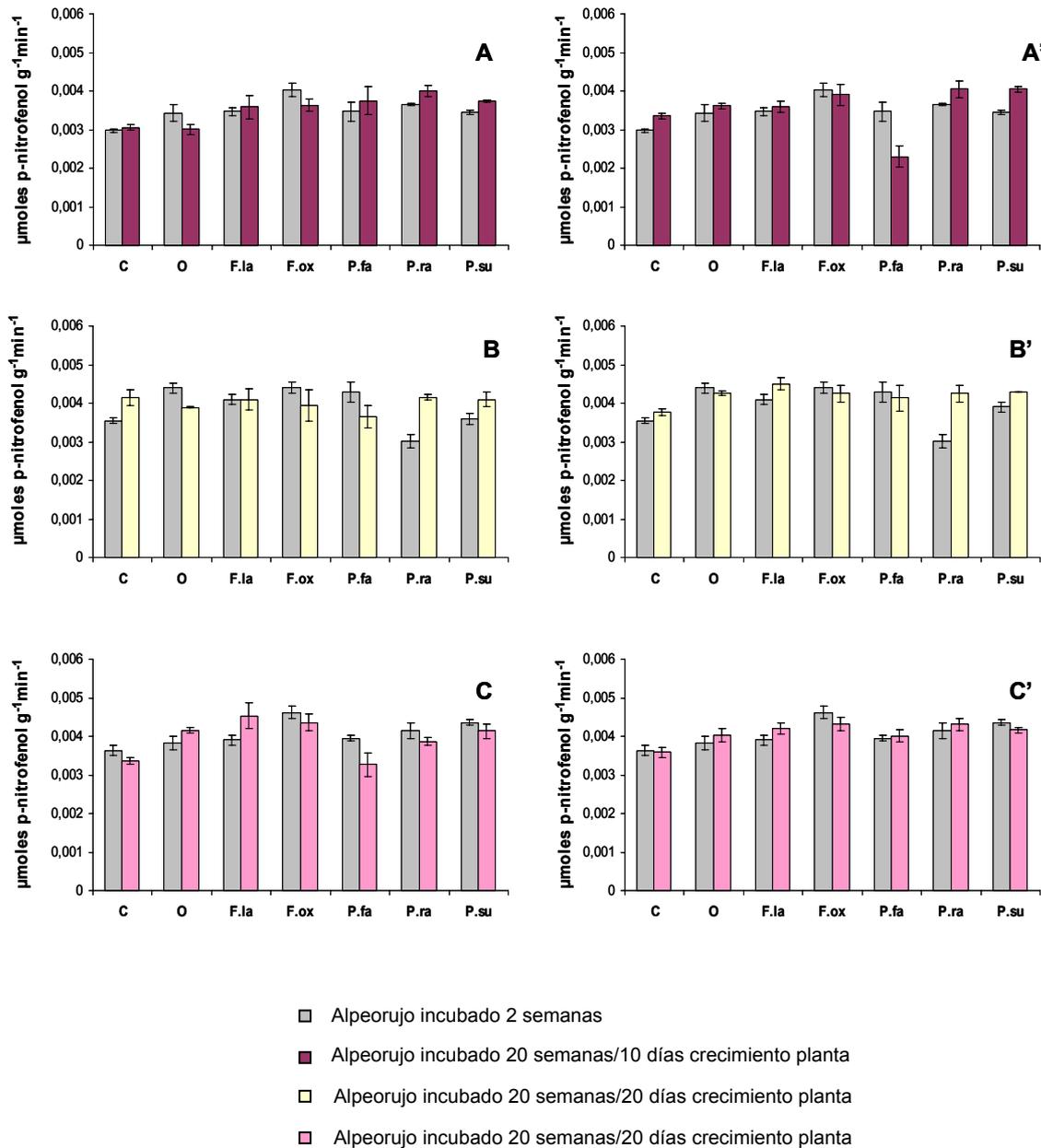


Fig. 4. Actividad β -glucosidasa detectada en suelo de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) (A, B, C) y plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (A', B', C') crecidas 10, 20 y 30 días, sin alpeorujos (C), con alpeorujos secos y extractados no inoculados (60 g/Kg) (O) y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Pa. farinosus* (P.fa), *C. rígida* (C.ri), *Ph. radiata* (P.ra) y *Po. subvermispota* (P.su). Las barras en cada columna indican el error estándar.

3.6.2. Microorganismos del suelo

Los resultados de la cuantificación de hongos en el suelo de plantas de tomate mostraron que la adición de alpeorujos sin inocular supuso el aumento del número de hongos. Cuando el alpeorujos se incubó con diferentes hongos saprobios durante 2 semanas no modificó o disminuyó la cantidad de hongos, salvo en los tratamientos con *F. lateritium* y *Po. subvermispora* en los que se observó un marcado aumento (Tabla 1). No se detectaron valores significativos de hongos en los tratamientos sin planta. Cuando el alpeorujos se incubó durante 20 semanas los resultados obtenidos variaron dependiendo del tiempo de crecimiento de la planta. Así, cuando las plantas se crecieron durante 10 y 20 días, se observó un aumento del número de hongos al añadir alpeorujos sin inocular siendo mayor este aumento cuando el alpeorujos se incubó con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *Ph. radiata* y *Po. subvermispora*, no detectándose valores significativos con la incubación con el resto de hongos ensayados. La cantidad de hongos fue mayor en los tratamientos con planta. Para el tiempo de crecimiento de las plantas de 30 días, no hubo diferencias del número de hongos con el resto de tiempos en los tratamientos sin planta. Sin embargo, en los tratamientos con planta el número de hongos fue superior en la mayoría de los casos estudiados, detectándose un aumento de la cantidad de hongos con respecto a plantas sin alpeorujos, excepto con los hongos *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*. El mayor aumento en el número de hongos se obtuvo al añadir alpeorujos incubado durante 20 semanas incubado con los diferentes hongos saprobios a plantas de tomate crecidas por un período de 30 días.

La cuantificación de hongos en el suelo de plantas de alfalfa mostraron que la adición de alpeorujos sin inocular e inoculado con los diferentes hongos saprobios durante 2 semanas no modificó el número de hongos (Tabla 2). No se detectaron valores significativos de hongos en los tratamientos sin planta. Cuando el alpeorujos se incubó durante 20 semanas y a diferencia con los resultados obtenidos en plantas de tomate, el mayor aumento en el número de hongos se obtuvo al añadir alpeorujos a plantas de alfalfa crecidas durante 10 o 20 días, aunque cabe destacar que para dichos períodos de crecimiento no se detectaron valores significativos de hongos para determinadas incubaciones que si se detectaron para el crecimiento de 30 días. La cantidad de hongos en la mayoría de los casos fue mayor en los tratamientos con planta (Tabla 2).

Tabla 1. Número de colonias de hongos detectados en suelo sin plantas y con plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas a diferentes tiempos, sin alpeorujó, con alpeorujó seco y extractado no inoculado y en presencia de alpeorujó incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Alpeorujó incubado							
	2 semanas		20 semanas					
	SP	CP	10 días		20 días		30 días	
			SP	CP	SP	CP	SP	CP
Control	-	3.10 ²	1.10 ²	4.10 ²	1.10 ²	6.10 ²	5.10 ²	2.10 ²
Alpeorujó	-	4.10 ²	4.10 ²	9.10 ²	6.10 ²	6.10 ²	9.10 ²	3.10 ³
<i>F. lateritium</i>	-	1.10 ³	2.10 ²	3.10 ³	4.10 ²	2.10 ³	9.10 ²	1.10 ³
<i>F. oxysporum</i>	-	4.10 ²	15.10 ²	2.10 ³	11.10 ²	6.10 ²	19.10 ²	5.10 ³
<i>Pa. farinosus</i>	-	4.10 ²	56.10 ²	1.10 ³	66.10 ²	2.10 ³	28.10 ²	7.10 ³
<i>C. rígida</i>	-	1.10 ²	-	-	-	-	-	6.10 ²
<i>Ph. radiata</i>	-	4.10 ²	2.10 ²	4.10 ²	11.10 ²	6.10 ²	3.10 ²	3.10 ²
<i>Po. subvermispora</i>	-	3.10 ³	5.10 ²	2.10 ³	24.10 ²	1.10 ³	13.10 ²	4.10 ³
<i>Pha. chrysosporium</i>	-	3.10 ²	-	-	-	-	-	5.10 ²
<i>Py. cinnabarinus</i>	-	1.10 ²	-	-	-	-	-	1.10 ²
<i>Pl. pulmonarius</i>	-	4.10 ²	-	-	-	-	-	2.10 ²

Tabla 2. Número de colonias de hongos detectados en suelo sin plantas y con plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas a diferentes tiempos, sin alpeorujo, con alpeorujo seco y extractado no inoculado y en presencia de alpeorujo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Alpeorujo incubado							
	2 semanas		20 semanas					
	SP	CP	10 días		20 días		30 días	
			SP	CP	SP	CP	SP	CP
Control	-	5.10 ²	1.10 ²	5.10 ²	1.10 ²	6.10 ²	5.10 ²	7.10 ²
Alpeorujo	-	5.10 ²	4.10 ²	16.10 ²	6.10 ²	8.10 ²	9.10 ²	9.10 ²
<i>F. lateritium</i>	-	4.10 ²	2.10 ²	81.10 ²	4.10 ²	24.10 ²	9.10 ²	14.10 ²
<i>F. oxysporum</i>	-	7.10 ²	15.10 ²	50.10 ²	11.10 ²	64.10 ²	19.10 ²	11.10 ²
<i>Pa. farinosus</i>	-	4.10 ²	56.10 ²	2.10 ²	66.10 ²	41.10 ²	28.10 ²	4.10 ²
<i>C. rígida</i>	-	2.10 ²	-	-	-	-	-	1.10 ²
<i>Ph. radiata</i>	-	-	2.10 ²	1.10 ²	11.10 ²	19.10 ²	3.10 ²	3.10 ²
<i>Po. subvermispora</i>	-	8.10 ²	5.10 ²	4.10 ²	24.10 ²	11.10 ²	13.10 ²	4.10 ²
<i>Pha. chrysosporium</i>	-	2.10 ²	-	-	-	-	-	6.10 ²
<i>Py. cinnabarinus</i>	-	2.10 ²	-	-	-	-	-	4.10 ²
<i>Pl. pulmonarius</i>	-	2.10 ²	-	-	-	-	-	1.10 ²

Los resultados de la cuantificación de bacterias en el suelo de plantas de tomate mostraron que la adición de alpeorujos sin inocular supuso el aumento del número de bacterias. Cuando el alpeorujos se incubó con diferentes hongos saprobios durante 2 semanas disminuyó en mayor o menor medida la cantidad de bacterias (Tabla 3). No se detectaron valores significativos de hongos en los tratamientos sin planta. Cuando el alpeorujos se incubó durante 20 semanas los resultados obtenidos variaron dependiendo del tiempo de crecimiento de la planta. El mayor número de bacterias se detectó en plantas de tomate crecidas 10 días, en las que la adición de alpeorujos sin inocular y alpeorujos incubados con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *Ph. radiata* y *Po. subvermispora* supuso el aumento del número de bacterias con respecto a plantas sin alpeorujos, no detectándose en el resto de incubaciones valores significativos de bacterias. Las diferencias entre tratamientos con y sin planta fueron variables para las diferentes incubaciones ensayadas (Tabla 3). Los resultados obtenidos en plantas crecidas durante 20 días fueron similares a los de plantas crecidas 10 días, aunque se detectó una menor cantidad de bacterias. El menor número de bacterias se detectó en plantas crecidas 30 días, exceptuando las incubaciones con los hongos *Pha. chrysosporium* y *Pl. pulmonarius*.

La cuantificación de bacterias en el suelo de plantas de alfalfa mostraron que la adición de alpeorujos sin inocular supuso el aumento del número de bacterias. Cuando el alpeorujos se incubó con diferentes hongos saprobios durante 2 semanas disminuyó en mayor o menor medida la cantidad de bacterias y la aumentó con las incubaciones con *C. rigida*, *Ph. radiata* y *Po. subvermispora* (Tabla 4). No se detectaron valores significativos de hongos en los tratamientos sin planta. Al igual que lo observado en plantas de tomate, el mayor número de bacterias se detectó en plantas de alfalfa crecidas 10 días obteniéndose los valores más altos en las incubaciones del alpeorujos con los hongos *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *Ph. radiata* y *Po. subvermispora*, no detectándose en el resto de incubaciones valores significativos de bacterias. El menor número de bacterias se detectó en plantas crecidas 30 días, exceptuando las incubaciones con los hongos *Pa. farinosus* y *Ph. radiata*.

Tabla 3. Número de colonias de bacterias detectadas en suelo sin plantas y con plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) crecidas a diferentes tiempos, sin alpeorujos, con alpeorujos secos y extractados no inoculados y en presencia de alpeorujos incubados durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rigida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Alpeorujos incubados							
	2 semanas		20 semanas					
	SP	CP	10 días		20 días		30 días	
			SP	CP	SP	CP	SP	CP
Control	-	52.10 ³	28.10 ⁶	25.10 ⁶	59.10 ⁵	13.10 ⁵	31.10 ⁴	20.10 ⁴
Alpeorujos	-	79.10 ³	16.10 ⁷	43.10 ⁶	87.10 ⁵	25.10 ⁵	59.10 ⁴	22.10 ⁴
<i>F. lateritium</i>	-	17.10 ³	16.10 ⁷	29.10 ⁶	89.10 ⁵	23.10 ⁶	45.10 ³	19.10 ⁴
<i>F. oxysporum</i>	-	18.10 ³	49.10 ⁶	66.10 ⁶	59.10 ⁵	49.10 ⁶	62.10 ³	32.10 ⁴
<i>Pa. farinosus</i>	-	16.10 ³	43.10 ⁶	10.10 ⁷	23.10 ⁵	79.10 ⁶	17.10 ⁴	23.10 ⁴
<i>C. rigida</i>	-	13.10 ³	-	-	-	-	-	20.10 ⁴
<i>Ph. radiata</i>	-	29.10 ³	29.10 ⁶	63.10 ⁶	30.10 ⁵	38.10 ⁶	46.10 ³	12.10 ⁴
<i>Po. subvermispora</i>	-	23.10 ³	17.10 ⁷	68.10 ⁶	43.10 ⁵	28.10 ⁶	31.10 ³	15.10 ⁴
<i>Pha. chrysosporium</i>	-	14.10 ³	-	-	-	-	-	80.10 ⁵
<i>Py. cinnabarinus</i>	-	34.10 ³	-	-	-	-	-	31.10 ⁴
<i>Pl. pulmonarius</i>	-	13.10 ³	-	-	-	-	-	20.10 ⁵

Tabla 4. Número de colonias de bacterias detectadas en suelo sin plantas y con plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas a diferentes tiempos, sin alpeorujo, con alpeorujo seco y extractado no inoculado y en presencia de alpeorujo incubado durante 2 y 20 semanas con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *Pa. farinosus*, *C. rígida*, *Ph. radiata*, *Po. subvermispora*, *Pha. chrysosporium*, *Py. cinnabarinus* y *Pl. pulmonarius*.

Tratamiento	Alpeorujo incubado							
	2 semanas		20 semanas					
	SP	CP	10 días		20 días		30 días	
			SP	CP	SP	CP	SP	CP
Control	-	26.10 ³	28.10 ⁶	14.10 ⁶	59.10 ⁵	21.10 ⁵	31.10 ⁴	62.10 ⁴
Alpeorujo	-	43.10 ³	16.10 ⁷	91.10 ⁶	87.10 ⁵	17.10 ⁵	59.10 ⁴	82.10 ⁴
<i>F. lateritium</i>	-	7.10 ³	16.10 ⁷	29.10 ⁶	89.10 ⁵	89.10 ⁵	45.10 ³	84.10 ⁴
<i>F. oxysporum</i>	-	18.10 ³	49.10 ⁶	66.10 ⁶	59.10 ⁵	59.10 ⁵	62.10 ³	66.10 ⁴
<i>Pa. farinosus</i>	-	16.10 ³	43.10 ⁶	93.10 ⁶	23.10 ⁵	23.10 ⁵	17.10 ⁴	46.10 ⁵
<i>C. rígida</i>	-	38.10 ³	-	-	-	-	-	20.10 ⁶
<i>Ph. radiata</i>	-	29.10 ⁴	29.10 ⁶	63.10 ⁶	30.10 ⁵	30.10 ⁵	46.10 ³	73.10 ⁵
<i>Po. subvermispora</i>	-	35.10 ³	17.10 ⁷	68.10 ⁶	43.10 ⁵	43.10 ⁵	31.10 ³	46.10 ⁴
<i>Pha. chrysosporium</i>	-	22.10 ³	-	-	-	-	-	60.10 ⁴
<i>Py. cinnabarinus</i>	-	13.10 ³	-	-	-	-	-	23.10 ⁵
<i>Pl. pulmonarius</i>	-	15.10 ³	-	-	-	-	-	26.10 ⁶

3.6.3. TGGE

Los estudios de identificación molecular de bacterias del suelo realizados mediante una electroforesis del ADN bacteriano en gradiente de temperatura (TGGE) mostraron la heterogeneidad de la población bacteriana del suelo. En la Figura 1 puede observarse como el suelo de plantas de tomate crecidas sin alpeorujó presenta una serie de bandas (A-F) correspondientes a diferentes especies bacterianas que desaparecen cuando las plantas crecen en presencia de alpeorujó. Sin embargo, podemos destacar que al añadir alpeorujó se obtuvieron nuevas bandas (G y H) correspondientes a especies bacterianas que no se encontraron en plantas sin alpeorujó.

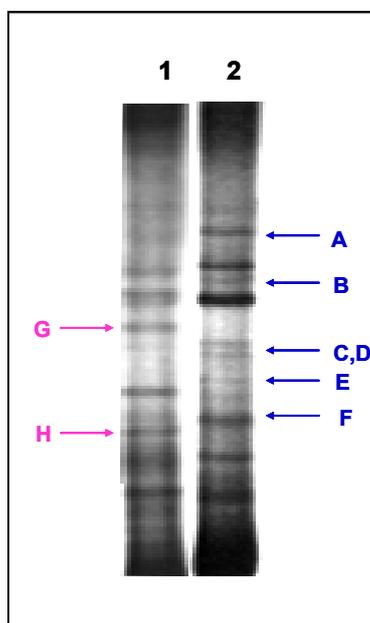


Fig. 1. Bandas de ADN bacteriano detectadas mediante electroforesis en gradiente de temperatura en suelo de plantas de tomate crecidas sin alpeorujó (2) y en presencia de alpeorujó (1).

Al añadir a plantas de tomate alpeorujó incubado con los hongos saprobios *Po. subvermispóra*, *Pa. farinosus* y *F. oxysporum*, se observó la presencia de bandas de ADN bacteriano que habían desaparecido al añadir a las plantas alpeorujó no inoculado, señaladas en color rojo en la Figura 2. Asimismo aparecieron determinadas bandas detectadas con alpeorujó no inoculado pero de forma más atenuada (Fig. 2). La incubación con los hongos *F. oxysporum* y *Pa. farinosus* mostró gran similitud de bandas con respecto a las obtenidas en el suelo de plantas sin alpeorujó.

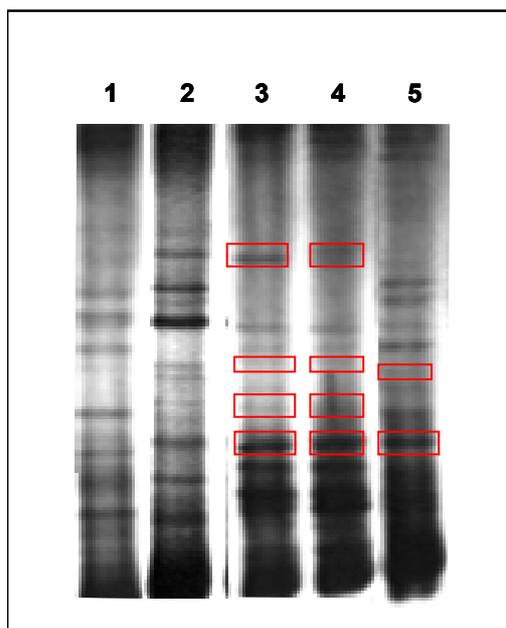


Fig. 2. Bandas de ADN bacteriano detectadas mediante electroforesis en gradiente de temperatura en suelo de plantas de tomate crecidas sin alpeorujo (2), con alpeorujo seco y extractado no inoculado (1) y en presencia de alpeorujo incubado con los hongos saprobios *Po. subvermispora* (3), *Pa. farinosus* (4) y *F. oxysporum* (5).

Discusión

El alpeorujo tiene marcadas propiedades fitotóxicas ya que se ha observado que la aplicación de 60 g/Kg de este a una mezcla de suelo y arena produjo una disminución del peso seco de las plantas ensayadas. Uno de los principales responsables de los efectos tóxicos originados en las plantas por los residuos son los compuestos fenólicos que comienzan a mostrar fitotoxicidad a concentraciones de 50 mg/Kg (Wang *et al.*, 1967; Fiestas Ros de Ursinos, 1986; Wang *et al.*, 2002). Es posible que el contenido fenólico del alpeorujo (6 mg/g) pueda ser el responsable de su fitotoxicidad, por lo que la adición de 60 g/Kg de alpeorujo (contenido fenólico 360 mg/Kg) daría lugar a la disminución del crecimiento de la planta. Se han analizado los efectos fitotóxicos individuales de diferentes fenoles, así, en ensayos de fitotoxicidad llevados a cabo en plantas de tomate y calabacín, Capasso *et al.*, 1992 mostraron que concentraciones de 1mM g/Kg de 4-metilcatecol causaron serios daños en las hojas. Por otro lado, se encontró que el ácido cafeico fue uno

de los componentes más fitotóxicos para plantas de espárrago y lechuga provocando una reducción de crecimiento a una concentración menor de 0,55 mM (Chou y Patrick, 1976; Hartung *et al.*, 1990). En estudios realizados con alpechín, se demostró que la fracción aromática de bajo peso molecular es particularmente tóxica (Capasso, 1997; Aliotta *et al.*, 2000; Florentino *et al.*, 2003) y se ha demostrado el sinergismo de efectos inhibitorios entre fenoles (Della Greca *et al.*, 2001).

Los microorganismos son capaces de disminuir la contaminación del suelo originada por los residuos tóxicos generados por las plantas (Arfmann y Rainer, 1990; Moreno *et al.*, 1990). Uno de los principales mecanismos de detoxificación de los microorganismos se han atribuido a su capacidad de metabolizar compuestos fenólicos (Hamman *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002). Todos los hongos ensayados fueron capaces de crecer en alpeorajo seco y extractado incubado estáticamente en ausencia de suplementos nutritivos externos y aeración forzada. Por otro lado, todos los hongos saprobios utilizados en nuestros ensayos fueron capaces de disminuir el contenido fenólico del alpeorajo y además se encontró correlación entre el descenso del contenido fenólico del alpeorajo por los hongos saprobios y la reducción de la fitotoxicidad del alpeorajo sobre el peso seco de plantas de tomate y soja. Relación entre descenso del contenido fenólico por actividad microbiana y disminución de fitotoxicidad fue anteriormente establecida por Blum *et al.* (2000) y Caspersen *et al.* (2000). Estos resultados sugieren que el descenso del contenido fenólico del alpeorajo causado por los hongos saprobios es importante para el descenso de fitotoxicidad. La mayoría de hongos saprobios estudiados disminuye la fitotoxicidad del alpeorajo aunque su efecto varía dependiendo de los hongos utilizados y del tiempo de incubación del alpeorajo con estos. Esta distinta actuación de los hongos saprobios se debe posiblemente a las diferencias en la maquinaria enzimática de cada hongo implicada en la degradación de compuestos fenólicos (Camarero *et al.*, 1994; Giovannozzi-Sermanni *et al.*, 1994). Además, la toxicidad del alpeorajo incubado con los distintos hongos saprobios, no disminuyó de la misma manera. Por ejemplo, la inoculación de alpeorajo con *T. koningii* y *Pa. farinosus* en plantas de soja y de tomate disminuyó el efecto inhibitorio de dicho residuo en plantas de tomate pero no en plantas de soja, mientras que la inoculación con *F. oxysporum* 3 y *P. brevicompactum* disminuyó el efecto fitotóxico en plantas de soja pero no en plantas de tomate a pesar del descenso de compuestos fenólicos en el alpeorajo. Se sabe que algunos compuestos fenólicos tienen efectos variables en la viabilidad de diferentes plantas (Wang *et al.*, 1967). Por lo tanto, existe la posibilidad de que estos hongos saprobios degraden ciertos fenoles que sean tóxicos para unas plantas y no lo sean para otras. Por otra parte, en determinadas circunstancias cuando un compuesto fenólico presente en residuos complejos

se metaboliza por una vía alternativa se pueden generar algunos compuestos intermedios tóxicos (Ramos y Timmis, 1987). Además, el efecto de sustancias fenólicas sobre el crecimiento de plantas podría ser distinto según el suelo donde se desarrolla la planta, de hecho, el contenido en materia orgánica y el pH de los suelos son factores importantes que influyen en la fitotoxicidad de los fenoles (Wang *et al.*, 1967).

Algunos de los hongos saprobios estudiados fueron capaces de eliminar la toxicidad del alpeorujó. *F. oxysporum* y *F. lateritium* transformaron totalmente el alpeorujó después de 20 semanas de incubación eliminado totalmente su fitotoxicidad, de modo que el peso de plantas de tomate a las que se adicionó alpeorujó transformado se incrementó con respecto a plantas a las que no se había añadido alpeorujó. El alpeorujó es tóxico para plantas de tomate y soja principalmente debido a su contenido fenólico. Casi todos los hongos saprobios ensayados fueron capaces de disminuir el contenido fenólico y la fitotoxicidad del alpeorujó aunque esta no puede ser debida solamente a su contenido fenólico. De hecho, recientemente se ha sugerido que la producción de enzimas hidrolíticos puede ser otro de los mecanismos de reducción de fitotoxicidad del alpeorujó (Aranda *et al.*, 2004).

El contenido fenólico del alpeorujó disminuyó al aumentar el tiempo de incubación del alpeorujó con hongos saprobios disminuyó dicho contenido. Es bien conocido que los compuestos fenólicos son fácilmente metabolizados por microorganismos (hongos y bacterias). Cultivos de hongos como *L. edodes*, *Pha. chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* redujeron el contenido total de fenoles en un porcentaje aproximado entre 65 y 90% en ausencia de suplementos externos adicionados (Martirani *et al.*, 1996; Kissi *et al.*, 2001; Fountoulakis *et al.*, 2002; D'Annibale *et al.*, 2004). Se han aislado varias especies pertenecientes al género *Fusarium* de suelos y efluentes industriales caracterizados por tener fenoles o hidrocarburos que han demostrado ser muy eficaces en la detoxificación de sólidos y matrices líquidas contaminadas por fenoles (Anselmo y Novais, 1992; Atagana, 2004; Mendonça *et al.*, 2004; Santos y Linardi, 2004).

Estudios relacionados con alpechín mostraron la eficacia en la reducción de fenoles de distintas especies de hongos algunas de las cuales han sido seleccionadas en nuestros ensayos. También se ha observado reducción del contenido fenólico en alpechines utilizando bacterias y levaduras (Pérez *et al.*, 1990; Fiestas y Borja, 1996).

En nuestros ensayos se ha encontrado que el pH del alpeorujó tratado durante 20 semanas con los hongos saprobios aumentó o disminuyó respecto al control según el hongo utilizado. Se sabe que el alto pH y la aireación aumentan la autooxidación de compuestos

fenólicos y taninos en compuestos fenólicos de alto peso molecular y taninos condensados resistentes a la degradación (Field y Lettinga, 1991; Assas *et al.*, 2002). En estudios de degradación de alpechín se ha observado un incremento de pH que se justifica como consecuencia de la biodegradación de compuestos tipo ácido y la mineralización de compuestos orgánicos (Paredes *et al.*, 2000). En nuestros estudios se corrobora los resultados expuestos para otros residuos ya que los hongos que descienden el pH tras la incubación durante 20 semanas fueron los que mostraron mayor capacidad para decolorar el alpeorujo.

Por otro lado, el elevado pH se convierte en factor no favorable para la actividad de decoloración de las enzimas. También se ha descrito que la producción de enzimas extracelulares por los hongos (Haddadin *et al.*, 2003), también puede disminuir el pH y con ello facilitar la decoloración del residuo por los hongos. De hecho incubaciones de alpechín fresco con *Geotrichum candidum* disminuyó el pH probablemente debido al consumo de azúcar por el hongo. Sin embargo, esta bajada de pH fue favorable para la decoloración de dicho residuo (Kim y Shoda, 1999).

Considerando la relación de pH y compuestos fenólicos hay que destacar que los fenoles disponibles en los residuos del olivar tuvieron un efecto antimicrobiano (Hill y Robinson, 1975; Rodríguez *et al.*, 1988) pero a pH neutro o ligeramente alcalino pasan a la forma de fenatos y pierden así una gran parte del poder antimicrobiano (Medeci *et al.*, 1985).

Se ha descrito el comportamiento de los fenoles monoméricos como sustancias tóxicas para la germinación de plantas aunque también se cree que la fracción polimérica de residuos como el alpechín y alpeorujo también participa en la toxicidad de dichos residuos. Debido a la dificultad de caracterización de la fracción polimérica de los residuos del olivar, se han llevado a cabo estudios que relacionan depolimerización con decoloración (Sayadi *et al.*, 2000; Kissi *et al.*, 2001; D'Annibale *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2004) y en algunos casos, con el grado de detoxificación. Se ha demostrado que existe una correlación entre la decoloración del alpechín y la reducción del carbono orgánico total y los compuestos fenólicos (Boominathan *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1994; Sayadi *et al.*, 1995., Vincinguerra *et al.*, 1995). De hecho para el hongo *Pha. chrysosporium*, la actividad de decoloración se suprimió cuando la carga orgánica del alpechín fue mayor de 55000 mg/l (Sayadi *et al.*, 2000). Por otro lado también hay resultados que indican una asimilación de los fenoles en la primera mitad del proceso de incubación pero no de compuestos coloreados similares a la lignina, lo que confirmaría que estos procesos no están relacionados (D'Annibale *et al.*, 1998). Los estudios de color (L^* , a^* , b^*) entre alpeorujo tratado y no tratado durante 2 y

20 semanas mostraron que la mayoría de hongos decoloraban el sólido, y que el efecto era más pronunciado tras 20 semanas de incubación. El mayor incremento de los parámetros de color se observó en alpeorujos incubados con el hongo *C. rigida*, seguido de *Ph. radiata*, *Py. cinnabarinus* y *Pha. chrysosporium*. Un estudio realizado con 46 hongos sobre la capacidad de estos de decolorar el alpechín demostró diferencias entre ellos aunque se destacaron también *Ph. radiata*, *Py. cinnabarinus* y *Pha. chrysosporium* como hongos muy efectivos en la decoloración del alpechín (Jaouani *et al.*, 2003). Buscar una explicación de las diferencias que muestran los hongos en decoloración no es fácil y falla la tentativa de correlacionar decoloración del alpechín con la producción de enzimas por los hongos (Jaouani *et al.*, 2003).

Hay hongos que producen enzimas que degradan hidrocarburos poliaromáticos, incluidos *Aspergillus niger* (Hamdi *et al.*, 1991), *Aspergillus terreus* (Martínez nieto *et al.*, 1993) y el hongo de la podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Sayadi *et al.*, 1995) así como especies de *Pleurotus* (Sanjust *et al.*, 1991; Zervakis *et al.*, 1996) y *Lentinus edodes* (D'Annibale *et al.*, 1998) que han sido usados para detoxificar y decolorar el alpechín. La decoloración por *Phanerochaete chrysosporium* fue por primera vez estudiada por Perez *et al.* 1987. Después, muchos autores describieron la decoloración del alpechín por diferentes hongos de la podredumbre blanca (Martínez *et al.*, 1986; Martiriani *et al.*, 1996; Sayadi *et al.*, 1992; Sayadi *et al.*, 1993; Vinciguerra *et al.*, 1995).

Varios mecanismos pueden explicar la diversa naturaleza del fenómeno responsable de la decoloración de residuos de la aceituna por hongos así como el hecho de que algunos hongos no muestren actividad decoloradora. Así, se ha demostrado que la adición de nutrientes simples o complejos es esencial para obtener una eficiente decoloración (Sayadi y Ellouz, 1993,1995); un ejemplo de ello es el efecto positivo de la adición de azúcares en la eliminación del color observado en algunos hongos ligninolíticos (Martín y Manzanares, 1994; Sayadi y Ellouz, 1995). Otro mecanismo explicativo aunque menos específico es la adsorción por el hongo de las moléculas cromofóricas a las células (Livernoche *et al.*, 1983). Esto puede explicar los resultados obtenidos con muchos cultivos como *Cerrioporiopsis subvermispota*, *Phlebia ostreamus*, *Ph. brevispora*, *Dichomitus squalens* y *Phanerochaete flavido-alba*. No solo los cromóforos solubles, sino también los sustratos cromóforos insolubles pueden ser transformados por cultivos de hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pha. flavido-alba* y *Coriolus versicolor* (Livernoche *et al.*, 1981,1983).

Los niveles de carbono extraíble del alpeorujos disminuyeron durante el proceso de incubación con los hongos saprobios, el porcentaje de disminución varió dependiendo del

tipo de hongo utilizado. Aunque el carbono extraíble debería aumentar en los procesos de estabilización de materia orgánica, predominando los procesos de humificación sobre los de mineralización (Albanell *et al.*, 1988; Elvira *et al.*, 1998), esto no ocurre si se cuantifican al inicio del proceso compuestos fácilmente degradables como azúcares, lípidos, aminoácidos, etc de los materiales de estudio (Ciavatta *et al.*, 1993; Benítez *et al.*, 2000a, 2002). Estos compuestos generalmente degradables por los microorganismos desaparecerán a lo largo del proceso de transformación del alpeorujo. De todos los hongos estudiados, la incubación del alpeorujo con *Pa. farinosus* fue el único que aumentó el carbono extraíble total respecto al control lo que correspondería a un posible proceso de humificación.

Los niveles de ácidos húmicos no se modificaron con la incubación de los hongos saprobios durante 2 semanas, sin embargo cuando el tiempo de incubación fue de 20 semanas aumentaron para todos los hongos de estudio, excepto con *C. rigida*, *Pha chryso sporium* y *Pl. pulmonarius*, donde no existen diferencias significativas entre el sustrato inicial o control y el alpeorujo incubado con estos hongos. Los niveles de ácidos fúlvicos del alpeorujo incubado con los diferentes hongos saprobios disminuyeron para ambos tiempos de incubación estudiados, excepto con el hongo *Pa. farinosus* que aumentó dichos niveles tras la incubación del alpeorujo con este hongo durante 20 semanas. Los resultados obtenidos mostraron un aumento de los compuestos orgánicos de alto peso molecular llamados ácidos húmicos que serían sintetizados por los hongos en el proceso de incubación del alpeorujo y un descenso de compuestos de bajo peso molecular denominados ácidos fúlvicos consumidos por dichos hongos.

Los niveles de macronutrientes del alpeorujo aumentaron, en la mayoría de los casos, tras la incubación con los hongos saprobios.

La dinámica del nitrógeno en el alpeorujo fue variable, observándose tanto aumentos como disminuciones según los tiempos de incubación de los diferentes hongos saprobios, destacando un aumento considerable de los niveles de nitrógeno con la incubación con *Pa. farinosus*. Los descensos podrían deberse al propio consumo por parte de los microorganismos o a pérdidas por volatilización de este elemento en forma de amonio (Butt, 1993; Nogales *et al.*, 1999a). Los aumentos estarían relacionados con el acumulo de éste debido a la mineralización de compuestos orgánicos contenidos en el alpeorujo, como proteínas, aminoácidos y péptidos en compuestos inorgánicos (Paredes *et al.*, 2000). En alpechines, valores altos de nitrógeno se justificaron debido a la descomposición de proteínas (Senesi *et al.*, 1996).

El resto de macronutrientes y micronutrientes analizados K, Na Mg, Ca, P, Fe, Cu, Zn y Mn presentan en la mayoría de las incubaciones del alpeorujo con los hongos saprobios concentraciones superiores a las que presenta el alpeorujo control. La dinámica de variación fue diferente según el tipo de hongo, el tiempo de incubación y el elemento. El aumento de estos nutrientes en mayor o menor medida dependiendo de las distintas variables podría deberse a la mineralización de la materia orgánica.

Respecto a los otros metales pesados analizados (Cd, Ni, Co y Pb) ninguno de ellos se detectó por la metodología analítica utilizada.

Los niveles de lignina no se modificaron con la incubación del alpeorujo con los hongos saprobios durante 2 semanas, salvo en el caso del hongo *Pha. chrysosporium*, que provocó un leve aumento. Sin embargo, la incubación del alpeorujo durante 20 semanas supuso un aumento de la lignina respecto al alpeorujo no inoculado en la mayoría de los hongos estudiados. Aunque la biodegradación de la lignina es un proceso natural llevado a cabo principalmente por hongos basidiomicetes (KirK y Farell., 1987), se ha demostrado una moderada capacidad de degradación de la lignina por algunos deuteromicetes del suelo, por ejemplo *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Penicillium chrysogenum*. Estos hongos degradaron varios compuestos relacionados con la lignina (Regalado *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1996a) así como otros compuestos de este polímero (Ohta *et al.*, 1979; Nazareth y Mavinkurve., 1986). También otro deuteromicete *Paecilomyces inflatus* tuvo la capacidad de modificar lignina sintética (Kluczek-Turpeinen *et al.*, 2003), aunque fue mucho menos eficiente que los hongos basidiomicetes descomponedores de la madera. La moderada actividad de degradación de la lignina indica que los hongos por sí solos no son los únicos responsables de la mineralización de la lignina. Los resultados obtenidos mostraron que la incubación del alpeorujo tanto con hongos basidiomicetes como deuteromicetes no dio lugar a la degradación ni de lignina ni de hemicelulosa y celulosa. El hecho de que no se produzca un proceso de biodegradación y se incremente la fracción de lignina podría explicarse por un fenómeno de policondensación y neosíntesis de fracción orgánica. También se observó una ausencia de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa en procesos de descomposición del alpechín, efecto que se justificó a la baja biodegradabilidad de la lignina así como a la reducida superficie para la acción de los microorganismos que presenta este residuo. Resultados similares se obtuvieron en el proceso de compostaje del alpechín mezclado con otros residuos (Monteoliva-Sánchez *et al.*, 1996), en estudios de vermicompostaje donde se utilizó otro tipo de residuos orgánicos no recalcitrantes (Conchary *et al.*, 1992) o residuos lignocelulósicos (Vincelas-Akpa y Loquet., 1996).

Para mejorar la degradación, se propone que la delignificación sería más completa si el sustrato se hubiera sometido previamente al tratamiento con xilanasa (Kantelinen *et al.*, 1993). De acuerdo con esta hipótesis, las hemicelulasas podrían mejorar la accesibilidad del sustrato a las enzimas modificadoras de la lignina y consecuentemente a la extracción de la lignina.

La incubación del alpeorujó con los hongos saprobios durante 2 semanas supuso un leve descenso del contenido en azúcares totales, mientras que este fue mayor al aumentar el tiempo de incubación a 20 semanas. El descenso de azúcares tuvo lugar en el período de tiempo comprendido entre 2 y 20 semanas, sin embargo en biotratamientos de alpechín se observó una degradación más rápida ya que los azúcares se degradaron en gran medida entre 3 y 7 días de incubación (Piperidou *et al.*, 2000). El descenso de azúcares en estos residuos podría ser debido a la fermentación de estos en ácidos orgánicos (Hamdi *et al.*, 1992). Debido a que los basidiomicetes son organismos quimioorganotróficos y tienen la capacidad de utilizar muchas fuentes de carbono orgánico para su metabolismo (Fell *et al.*, 2001), el incremento de la producción de biomasa sugirió que compuestos orgánicos del alpechín eran usados como fuentes de carbono y energía por el hongo. De hecho se ha observado esta reducción de ácidos orgánicos en la inoculación de alpechín con *Azotobacter vinelandii* después de una semana de incubación (Ehaliotis *et al.*, 1999). En el biotratamiento de alpeorujó se producirían también ácidos orgánicos, tras la fermentación de los azúcares que podrían ser consumidos por los hongos saprobios lo que provocaría un aumento del pH del sustrato como se ha observado en nuestros estudios.

El contenido total de fenoles solubles en agua del alpeorujó no varió significativamente tras la incubación durante 2 semanas con *F. lateritium* y *F. oxysporum*. La reducción de algunos componentes aromáticos simples del alpeorujó incubado con dichos hongos tras 2 semanas de incubación mediante RP-HPLC fue compensada mediante un incremento del contenido en hidroxitirosol y tirosol. Esto podría explicarse considerando que estos compuestos están a menudo presentes en los residuos del olivar como glucósidos (Maestro-Durán *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 2002), por lo tanto, el incremento de la concentración de estos compuestos puede ser debido a la hidrólisis del enlace glicosídico de dichos compuestos, catalizada por la enzima β -glucosidasa cuya actividad fue detectada en alpeorujó incubado con los hongos durante 2 semanas.

El impacto de la incubación del alpeorujó con los hongos saprobios en el contenido total de fenoles fue evidente tras 20 semanas de incubación. La reducción de los fenoles

extractados con acetato de etilo del 80 y 65% en el caso de *F. lateritium* y *F. oxysporum*, respectivamente, puede ser debida a una polimerización de estos más que a desaparición de compuestos fenólicos. Esto podría explicarse por el notable incremento de la abundancia de fenoles de la fracción correspondiente al peso molecular aproximado de 100-kDa (fracción F1) con respecto al control incubado (56,2% y 20,9% en el caso de *F. lateritium* y 53% y 18,5% para *F. oxysporum*).

Se ha descrito que polifenoles existentes en el alpeorujo, aguas residuales de la obtención de la aceituna y del alpechín, son de naturaleza muy tóxica y a su vez diversa (Moreno *et al.*, 1990). Los principales fenoles monoméricos del alpeorujo del extracto metanólico-agua del alpeorujo fueron hidroxitirosol, hidroxitirosol glucósido, tirosol y salidrósido (tirosol glucósido). También se ha detectado como polifenol principal el hidroxitirosol glucósido en aceitunas maduras y en alpechín (Romero *et al.*, 2002). Sin embargo con esta extracción no se observaron en el alpeorujo otros polifenoles previamente detectados en residuos de aceituna, como los ácidos vainillico, p-cumárico, ferúlico y vainillina (Casa *et al.*, 2003; Lesage-Meessen *et al.*, 2001). Este hecho puede atribuirse a las diferencias entre el material (variedad de aceituna) y el procesamiento, aunque también puede ser debido a que la extracción con hexano y las diferentes etapas de secado durante el procesado del alpeorujo podría dar lugar a una reducción de ciertos polifenoles respecto al material de origen de la aceituna, generalmente asociados con glucósidos mediante enlaces éter o ester, son probablemente degradados durante el proceso de extracción del aceite (Perrin, 1992). Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados en pasta de aceituna y alpechín no se han encontrado glucósidos de hidroxitirosol y tirosol ya que estos compuestos no se extraen con acetato de etilo que es el solvente más utilizado para la extracción de alpeorujo.

Son interesantes los resultados que muestran que el biotratamiento de alpeorujo durante 20 semanas con hongos saprobios provocó la eliminación de todos los fenoles monoméricos, sin embargo, 2 semanas de incubación fue poco tiempo de incubación como para producir la eliminación aunque si los reduce considerablemente. Debe considerarse que la habilidad de degradación de los hongos saprobios depende de la concentración de oxígeno y por lo tanto de la porosidad de la matriz, parámetro importante que influencia en la mayoría de los casos el desarrollo de los experimentos. De hecho se ha encontrado un descenso del 70% de los polifenoles totales en la pulpa de aceituna tratada durante 10 semanas con *Phanerochaete flavido-alba* (Linares *et al.*, 2003), aunque una tendencia similar se observó en alpechín tratado durante 2 semanas con *Pleurotus ostreatus* (Aggelis

et al., 2003). De hecho, en nuestros ensayos se ha descrito que *Pha. chrysosporium* fue más efectivo que *Pl. ostreatus* en la eliminación de compuestos fenólicos. Se han encontrado diferencias significativas en disminución de fenoles y decolorización de residuos del olivar según los hongos utilizados y el tiempo de incubación (Kissi *et al.*, 2001). Estos estudios justifican que en nuestros ensayos se hayan encontrado diferentes comportamientos respecto a la disminución de fenoles de alpeorujo incubado durante 2 semanas con los diferentes hongos saprobios.

Py. cinnabarinus y *F. lateritium* eliminaron prácticamente hidroxitirosol y su glucósido del alpeorujo, sin embargo tirosol se comportó como el compuesto más recalcitrante. Estos resultados se asemejan a los descritos previamente para alpechín donde los o-difenoles como hidroxitirosol se degradaron más rápidamente que monofenoles (D'Annibale *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996).

Por otra lado, *Lentinus edodes* necesitó 10 días para disminuir a la mitad el contenido de tirosol del alpechín (D'Annibale *et al.*, 2004) y *Azotobacter vinelandii* tras 7 días de incubación fue capaz de eliminar completamente dicho compuesto en el mismo residuo (Piperidou *et al.*, 2000).

De todos los hongos saprobios estudiados, solo *Pha. chrysosporium* incubado durante 2 semanas fue capaz de eliminar el tirosol del alpeorujo. También se ha demostrado que este hongo es el más efectivo en la eliminación de fenoles tales como los ácidos siríngico, vainíllico, p-hidroxi-benzoico y p-cumárico de residuos de maíz (Chen *et al.*, 1996). Se supone que enzimas liberadas por los hongos saprobios durante la incubación de los residuos del olivar primero oxidan y posteriormente polimerizan los fenoles monoméricos, pero solo existe un artículo en el que se describa la transformación del tirosol durante el tratamiento con hongos (Vinciguerra *et al.*, 1997). Estos estudios muestran que el tirosol se transforma en una cetona dimérica tetracíclica, pero no muestran posteriores reacciones.

Hidroxitirosol es un compuesto que contribuye al potencial biológico del aceite de oliva (Ryan y Robarts, 1988) y alpechín (Visioli *et al.*, 1995) debido a su potente actividad antioxidante (Galli y Visioli, 1999; Manna *et al.*, 1999). Este compuesto puede obtenerse a partir de aceite de oliva (Chikamatsu *et al.*, 1996), de pasta de aceitunas (Felizón *et al.*, 2000), de huesos de aceituna y alpechín (Fernández-Bolaños *et al.*, 1988, 2002) mediante tratamiento al vapor. Además se han desarrollado otros métodos de producción de hidroxitirosol como: métodos cromatográficos de purificación de alpechín (Capasso *et al.*, 1994) y procedimientos sintéticos (Verhe *et al.*, 1992). El hongo *Pa. farinosus* tuvo un comportamiento singular en la incubación del alpeorujo ya que hidrolizó los fenoles glucósidos en sus respectivos fenoles simples. Una posible explicación podría ser que el

hongo liberara una gran cantidad del enzima β -glucosidasa capaz de romper el enlace glucosídico de los fenoles glucósidos. Este resultado tan interesante nos abre una nueva posibilidad de bajo consumo energético de uso del alpeorujo como sustrato para la obtención de antioxidantes fenólicos, concretamente el hidroxitirosol.

Podemos concluir que todos los fenoles monoméricos del alpeorujo seco y extractado se eliminaron tras la incubación de este durante 20 semanas con todos los hongos saprobios utilizados. El diferente comportamiento de los hongos después de 2 semanas de incubación es importante para optimizar el biotratamiento del alpeorujo.

Se han aislado de especies del género *Fusarium* de suelo y efluentes industriales caracterizados por la presencia de fenoles y compuestos aromáticos (Atagana, 2004; Santos y Linardi, 2004). Estos aislados han sido descritos como altamente efectivos en la detoxificación de sustratos contaminados con fenoles tanto sólidos como líquidos (Anselmo y Novais, 1992; Atagana, 2004; Mendonca *et al.*, 2004).

Los fenoles mayoritarios encontrados en el extracto de acetato de etilo de alpeorujo seco y extractado fueron hidroxitirosol, tirosol y catecol. No se encontró hidroxitirosol glucósido que previamente había sido identificado en aceitunas maduras y en alpechín (Romero *et al.*, 2002), así como en la extracción que realizamos con metanol, por lo que suponemos que el método de extracción del residuo influye en el aislamiento de los distintos compuestos fenólicos. Se detectaron otros seis compuestos fenólicos 4-metilcatecol, ácido vainillico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico, dos de los cuales eran compuestos no fenólicos, los ácidos 3,4- dimetoxicinámico y 4- metoxicinámico. En numerosos estudios se ha confirmado la eficiencia de la extracción con acetato de etilo para detectar compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Visioli *et al.*, 1999). La extracción con este solvente tanto de alpeorujo como de alpechín, mostró como componentes mayoritarios, hidroxitirosol y tirosol (Lesage-Meessen *et al.*, 2001) aunque no catecol, compuesto identificado en nuestros ensayos. Otros ácidos fenólicos, como ácido protocatéquico, ácido veratrílico, sirngico, cinámico o p-hidroxyfenilacético, encontrados en el alpechín mediante extracción con acetato de etilo por Balice y Cera (1984) y Lafont *et al.* (1999), no se detectaron en nuestros ensayos debido posiblemente a la pérdida de compuestos que supone el procesamiento de este residuo.

La incubación del alpeorujo con hongos saprobios durante 2 semanas supuso sólo la disminución de algunos compuestos monocíclicos mientras que al aumentar las semanas de incubación hasta 20 semanas se eliminaron en todos los hongos estudiados los compuestos hidroxitirosol, catecol y 3,4-dimetoxicinámico. Los resultados obtenidos son similares a los

de estudios realizados con alpechín en los que la incubación con el hongo *Lentinus edodes* supuso la eliminación de catecol y derivados del ácido cinámico (D'Annibale *et al.*, 2004).

El impacto del crecimiento del hongo saprobio sobre la fracción aromática del alpeorajo se hizo evidente después de 20 semanas de incubación. El porcentaje de reducción obtenido en los hongos del género *Fusarium* estudiados (65-80%) de los fenoles extractables en acetato de etilo parece que son debidos a su polimerización en lugar de reacciones de rotura de anillos. De hecho, análisis mediante RP-HPLC y GC-MS no mostraron productos típicos de la rotura de anillos como ácidos mucónicos o carboximucónicos y sus lactosas derivadas. Además, no se detectaron actividades intracelulares implicadas en la hidroxilación y rotura de anillos fenólicos independientemente del tiempo de incubación.

Es importante destacar que algunos estudios mostraron la capacidad de algunas especies de *Fusarium* de crecer en fenoles como única fuente de carbono en las que se detecta enzimas como la catecol-1,2-dioxigenasa o protocatecol-3,4-dioxigenasa sugiriendo la presencia de rutas de rotura de anillos del tipo ortho (Boominathan *et al.*, 1989; Santos y Linardi, 2004).

El incremento en el contenido de lignina polimérica precipitable en ácido (APPL) del alpeorajo incubado con los hongos *F. lateritium* y *F. oxysporum* durante 20 semanas con respecto al control incubado y al alpeorajo incubado durante 2 semanas y el cambio en la distribución del peso molecular de APPL podría atribuirse tanto a una fragmentación parcial de la lignina como a la formación de oligómeros a través de acoplamientos oxidativos de componentes aromáticos simples (Crawford *et al.*, 1984; Giovannozzi Sermanni *et al.*, 1991). Hay que tener en cuenta que APPL, al ser un polímero intermediario en la degradación de la pared celular de plantas es un carbohidrato más complejo que la lignina (Crawford y Pometto, 1988; Giovannozzi Sermanni *et al.*, 1991) por lo que el incremento observado puede ser debido a la acción de enzimas hidrolíticas y ligninolíticas.

La transformación parcial de fenoles monocíclicos en productos poliméricos en cultivos de 20 semanas pudo ser la causa de la reducción de la fitotoxicidad observada en plantas de tomate. Así, se ha sugerido que el aumento del grado de polimerización de los productos de reacción de las fenoloxidasas con respecto a los compuestos originales pudo dar lugar en un enorme descenso de la accesibilidad a la membrana celular de la planta (Casa *et al.*, 2003).

El incremento en APPL obtenido en nuestros experimentos con alpeorajo ha sido también observado en otros estudios llevados a cabo con distintos hongos y diferentes residuos (Crawford *et al.*, 1984). Los estudios realizados con *Streptomyces viridosporus*

mostraron que este hongo solubiliza la lignina para acceder a los polisacáridos que degradaría con celulasas y xilanasas extracelulares (Crawford *et al.*, 1984; Borgmeyer *et al.*, 1985). Por otro lado, se observó la influencia del tipo de fuente de nutrientes presente en el residuo, así se ha demostrado que fuentes orgánicas de nitrógeno aumentaron la degradación de lignocelulosa y la producción de APPL en mayor cantidad que para fuentes de nitrógeno inorgánicas (Iyo *et al.*, 1988).

A pesar de la importancia de los enzimas hidrolíticos en la detoxificación de residuos de plantas (Benítez *et al.*, 2002) existe poca información del papel de las enzimas endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG) en la fitotoxicidad de residuos. Los resultados obtenidos mostraron que se detectó actividad endo-PMG en alpeorajo incubado con hongos saprobios y esta actividad es muy baja comparada con el resto de actividades hidrolíticas estudiadas, además presenta la peculiaridad de la disminución al aumentar el tiempo de incubación de los hongos. También se detectó actividad endoglucanasa y xiloglucanasa en alpeorajo incubado con los hongos saprobios y en este caso se produjo un incremento de dichas actividades al aumentar el tiempo de incubación. Los hongos saprobios produjeron gran cantidad de endoglucanasas y xiloglucanasas debido, posiblemente, a que son grandes descomponedores de materia orgánica merced a la producción de estos enzimas hidrolíticos y utilizan las fuentes de carbono procedentes de la descomposición de materia orgánica y paredes celulares del alpeorajo para su nutrición. Al inicio de su crecimiento utilizarían pectina y otros componentes del alpeorajo, utilizando celulosa y xiloglucano a tiempos de incubación mayores.

En residuos de maíz incubados con *Fusarium oxysporum* se han detectado también actividad endoglucanasa y xiloglucanasa (Panagiotou *et al.*, 2003).

En nuestro grupo de investigación se ha descrito que varios hongos son capaces de producir endo-PMG, endo-GN y endo-XG, cuando crecen en presencia de extracto acuoso de alpeorajo y que existe una correlación entre el descenso de fitotoxicidad del extracto acuoso del alpeorajo y la cantidad de enzimas hidrolíticos producidos por los hongos saprobios.

Los niveles de actividad lipasa aumentaron al incrementar el tiempo de incubación de los hongos saprobios en el alpeorajo. La dinámica de dicha actividad fue variable, siendo característico el aumento obtenido con la incubación del alpeorajo con los hongos *F. oxysporum*, *Pa. farinosus* y *Pl. pulmonarius* después de 20 semanas. Dicho aumento podría

estar relacionado con el aumento de los niveles de nitrógeno que estos hongos provocaron en el alpeorujo. De hecho y según varios autores, altas concentraciones de nitrógeno fueron eficaces para incrementar la producción de lipasas por los microorganismos (Ohnishi *et al.*, 1994; Druet *et al.*, 1992 y Petrovic *et al.*, 1990). En estudios realizados con alpechín, se cree que la presencia de inductores puede estimular la síntesis de lipasas con especificidad de ácidos grasos. La carencia de actividad lipasa detectada para algunos cultivos en el alpechín puede atribuirse a las condiciones ambientales rigurosos o por la dificultad en la liberación de lipasas unidas a la célula (Lanciotti *et al.*, 2005).

Al igual que lo observado en la actividad lipasa, los niveles de actividad esterasa aumentaron al incrementar el tiempo de incubación aunque el tipo de hongo influyó en los cambios producidos. La diferente forma de actuación de determinados microorganismos en cuanto a actividad esterasa se refiere, también se pudo observar en microorganismos del suelo que poseen diferente capacidad de hidrolizar ésteres de determinados herbicidas (Gaynor *et al.*, 1992).

La implicación de las enzimas ligninolíticas en la degradación de compuestos recalcitrantes es un tema controvertido. Algunos autores sugirieron que no estaban involucradas en el proceso (Bezalel *et al.*, 1996b; Ichinose *et al.*, 1999; Yadav y Reddy, 1992). Sin embargo, se ha observado la producción simultánea de lacasas y peroxidasas durante la degradación de contaminantes aromáticos y una posible implicación en los procesos de biotransformación (Gramss *et al.*, 1999; Okeke *et al.*, 1994).

Es ampliamente conocido, que la oxidación de fenoles, catalizada o mediada por estas enzimas, genera radicales fenoxi que son susceptibles de experimentar reacciones de acoplamiento no enzimáticas con la consiguiente formación de oligómeros. Varios estudios han mostrado la existencia de oxidasas modificadoras de la lignina en cultivos líquidos de *Fusarium* sp. (Falcón *et al.*, 1995; Regalado *et al.*, 1999; Saparrat *et al.*, 2000) y se han purificado y parcialmente caracterizado fenoloxidasas similares a lacasa (Curir *et al.*, 1997).

Los niveles de actividades fenoloxidasas detectados en alpeorujo incubado con los diferentes hongos saprobios fueron muy bajos y en la mayoría de los casos disminuían sus valores conforme aumentaba el tiempo de incubación. Caso especial fue el comportamiento de la aril-alcohol oxidasa ya que no se detectaron niveles de actividad.

En nuestro estudio las enzimas MnP y lacasa sólo se detectaron en la incubación con algunos de los hongos ensayados. Estos resultados están de acuerdo con aquellos que exponen que la variabilidad de enzimas ligninolíticas en diferentes especies de hongos y su producción depende de la composición y de las condiciones de cultivo (Rogalski *et al.*, 1991;

Schoemaker *et al.*, 1991). Asimismo, y de acuerdo con Hammer y Schauer (1997), el sistema enzimático oxidativo que posee cada hongo es característico del cultivo (strain) y no de la especie. Así las variaciones entre los cultivos representa un gran problema en el estudio del sistema enzimático oxidativo debido a la gran heterogeneidad de las especies (Domsch *et al.*, 1993; Hammer y Schauer., 1997).

La disminución de actividades ligninolíticas con el tiempo de incubación podría explicarse por la inactivación de las enzimas debido al largo tiempo de incubación hecho observado en cultivos de *F. solani* en los que la permanencia de cultivos por largos períodos podría haber provocado la diferencia de producción y la inhabilidad de secretar oxidasas extracelulares (Szklarz *et al.*, 1989). En este sentido, la ausencia total de actividad enzimática en el sobrenadante de cultivos no indica la carencia de capacidad de producir estos, el sistema enzimático puede ser inhibido por diferentes factores que interfieren en su expresión (Bollag y Leonowicz., 1984; Deshpance *et al.*, 1992).

La baja o nula actividad enzimática detectada podría explicarse si se asume que las moléculas enzimáticas activas están incorporadas en nuevos productos formados, probablemente de naturaleza soluble polimérica con la consiguiente inmovilización tal y como se ha observado en el caso de la actividad lacasa. Así, otros resultados obtenidos con enzimas de diferente naturaleza, como invertasas, fosfatasa y ureasa parecen apoyar esta hipótesis, la adsorción así como la incorporación de estas enzimas en complejos organo y organo-minerales redujeron fuertemente la actividad de las enzimas implicadas (Gianfreda *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2000).

Muchos estudios han confirmado los efectos de activación de la producción de enzimas ligninolíticos tanto en cultivos líquidos (Ardon *et al.*, 1996; Crestini *et al.*, 1996) como sólidos (Elisashvili *et al.*, 1998) en extractos de plantas que contienen fenoles. El alpechín es un extracto de plantas que contiene fenoles y su adición a cultivos líquidos conduce a un incremento de la producción de oxidasas modificadoras de la lignina en *L. edodes* (Vinciguerra *et al.*, 1995), *Pleurotus ostreatus* (Martirani *et al.*, 1996) y *Phanerochaete chrysosporium* (Kissi *et al.*, 2001). Este incremento de actividad enzimática en presencia de alpechín pudo ser debido a un posible mecanismo de defensa que condujo a la activación de oxidasas capaces de polimerizar fenoles simples dando así los productos de reacción incapaces de penetrar en las células (Sarkanen, 1991; Tomati *et al.*, 1991; Tsioulpas *et al.*, 2002) o por una respuesta fisiológica del hongo para superar los efectos tóxicos de algunos compuestos de los efluentes (Thurston, 1994), como fenómeno supuesto de inducción (Pérez *et al.*, 1998). Así, se han realizado estudios detallados usando hongos basidiomicetes y compuestos aromáticos simples y se ha comprobado la inducción de la

lacasa (Eggert *et al.*, 1996; Lundell *et al.*, 1990; Luterek *et al.*, 1997; Rogalski *et al.*, 1991a, 1991b; Pointing *et al.*, 2000). Los efectos estimulatorios de los compuestos aromáticos relacionados con la lignina en la lacasa han sido también descritos para deuteromicetes, por ejemplo *Fusarium proliferatum* y *Penicillium chrysogenum* (Regalado *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1996b).

Sin embargo en el alpeorujó, a pesar de la presencia de fenoles hemos encontrado niveles muy bajos o nulos de dichas actividades enzimáticas por lo que se piensa que es necesaria la presencia de fenoles para que se produzca una activación de la actividad lacasa pero concentraciones por encima de determinados niveles la inactivan (Tomati *et al.*, 1991; Tsioulpas *et al.*, 2002).

En nuestros estudios la actividad fosfatasa del alpeorujó incubado con los diferentes hongos saprobios durante 2 y 20 semanas fue similar a la obtenida en alpeorujó no incubado, excepto las incubaciones con los hongos *C. rigida* y *Ph. radiata* que mostraron niveles más altos de actividad. La fosfatasa es un enzima inducible por fosfato inorgánico en el medio pero que además es capaz de ser inhibida por el producto final de la reacción enzimática (Nannipieri *et al.*, 1979). Por otro lado, la actividad fosfatasa también puede verse disminuida en presencia de iones metálicos en el alpeorujó, los cuales interfieren en la reacción de la complejación del sustrato, en la de la combinación con el grupo activo de la enzima y también por reacción con el complejo enzima-sustrato (Juma y Tabatabai, 1978; Red *et al.*, 1987).

Respecto a los niveles de actividad β -glucosidasa, estos no se modificaron prácticamente por la incubación del alpeorujó con los hongos saprobios, sólo los hongos *F. oxysporum*, *Ph. radiata* y *Pha. chrysosporium* aumentaron levemente los niveles de dicha actividad e incluso otros hongos provocaron un leve descenso. Resultados similares se obtuvieron en procesos de vermicompostaje en los que las actividades β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa de los extractos orgánicos no se modificaron después de un período de 9 meses, sugiriendo una acumulación de la enzima en los complejos húmicos y probablemente la resistencia de tales complejos al ataque microbiano (Benítez *et al.*, 2004). El descenso de actividad β -glucosidasa se observó también en procesos de vermicompostaje, siendo especialmente significativo desde el mes 2 al mes 4. Este descenso estuvo relacionado con el consumo de la materia orgánica más fácilmente metabolizable (Benítez *et al.*, 2002). Este patrón fue similar al expuesto por otros autores para los procesos de compostaje y vermicompostaje de otros residuos orgánicos (Ceccanti y García., 1994; Benítez *et al.*, 1999a, b).

El alpeorujó tiene propiedades fitotóxicas, así, en este estudio se vio que la aplicación de 60 g/Kg a una mezcla de suelo y arena disminuyó el peso seco de plantas de tomate (ya visto en ensayos anteriores). Así en los ensayos realizados tanto con suelo no estéril como suelo estéril se observó la fitotoxicidad del alpeorujó. Como ya habíamos indicado anteriormente, dicha fitotoxicidad se podría atribuir al contenido fenólico de este, así, hay estudios respecto a los diversos fenoles analizados en el extracto etílico de alpeorujó, como los ácidos cumárico y ferúlico, que sugieren que en la naturaleza los ácidos trans-cinnámico, o-,m-,p-cumárico, ácido clorogénico y cumarina inhiben el crecimiento de plantas para todas las concentraciones. Sin embargo, los ácidos cafeico y ferúlico pueden promover o inhibir el crecimiento de plantas dependiendo de las concentraciones de ambos (Li *et al.*, 1993). Así, en la incubación del alpeorujó con hongos saprobios durante 2 semanas se observó un leve descenso del contenido fenólico que podría relacionarse con el leve descenso de la fitotoxicidad observado en plantas de tomate. Por otro lado, la incubación durante 20 semanas supuso la eliminación casi completa de los fenoles detectándose en los ensayos realizados con plantas de tomate y alpeorujó incubado durante este tiempo, la disminución o eliminación de la fitotoxicidad, según los casos. Hay que indicar que algunos hongos cuya incubación durante 20 semanas supuso la eliminación casi total de fenoles disminuyeron muy poco la fitotoxicidad, este resultado sugiere que la fitotoxicidad del alpeorujó no solo puede atribuirse a los polifenoles, sino que puede ser también debida a otros compuestos orgánicos e inorgánicos, tal y como se observó en estudios realizados con aguas de vegetación que mostraron fitotoxicidad incluso cuando se había eliminado su contenido fenólico mediante extracciones con acetato de etilo y n-butanol (Capasso *et al.*, 1992).

La fitotoxicidad del alpeorujó no se vio prácticamente afectada por la incubación con hongos saprobios durante 2 semanas en los tres tratamientos aplicados, suelo no estéril, suelo estéril y suelo estéril con micorriza. Sin embargo, para tiempos de incubación de 20 semanas, se observó para el tratamiento de suelo no estéril, una disminución generalizada de la fitotoxicidad, exceptuando tres hongos, *Pha. chrysosporium*, *Pl. pulmonarius* y *Py. cinnabarinus*; analizando el tratamiento de suelo estéril, se observa una mejora en la disminución del efecto fitotóxico con respecto al tratamiento anterior, sobre todo en aquellos hongos menos efectivos en el descenso de los niveles de fitotoxicidad. El tratamiento con micorriza fue el más efectivo, ya que la incubación del alpeorujó con los hongos saprobios supuso en la mayoría de los casos, un desarrollo de las plantas superior al de plantas sin alpeorujó o control. Por otro lado, cabe destacar que en plantas a las que se adicionó alpeorujó sin incubar, la micorriza no tuvo ningún efecto beneficioso. Estos resultados

podrían indicar que la micorriza supone un efecto beneficioso en el desarrollo de la planta cuando los niveles de fitotoxicidad del alpeorujito adicionados son muy bajos.

Por otro lado, el estudio de la longitud de raíz colonizada mostró en la mayoría de los casos valores similares de micorrización de los hongos MA para los tiempos de incubación de dos y veinte semanas, exceptuando los hongos *Po. subvermispora* y *Pa. farinosus* que dieron lugar a una disminución de la micorrización de hongos MA indígenas al aumentar el tiempo de incubación de estos en el alpeorujito.

El estudio de la longitud de raíz colonizada en tratamientos en los que se había adicionado micorriza exógena, mostró una variabilidad enorme para el tiempo de incubación de dos semanas según el tipo de hongo, destacando, sin embargo la linealidad de resultados para el tiempo de incubación de veinte semanas en todos los hongos estudiados, siendo estos niveles superiores a los detectados en el tiempo de incubación de dos semanas. Podríamos justificar este hecho suponiendo que la elevada disminución de fitotoxicidad del alpeorujito vehiculizada por la adición de micorriza exógena habría facilitado y estimulado un mayor desarrollo de ésta. Estos resultados contrastan con la idea ampliamente aceptada de que las micorrizas proporcionan pequeñas ventajas para el crecimiento de plantas en suelos fertilizados (Yanai *et al.*, 1995). El crecimiento rápido de plantas inoculadas comparadas con plantas no inoculadas en suelos enmendados puede estar relacionado con la capacidad del hongo de incrementar las reservas disponibles de P en el DOC (Nadian *et al.*, 1996).

Pudo observarse como las micorrizas indígenas incrementaron en mayor medida la sensibilidad de las plantas a la fitotoxicidad del alpeorujito que las micorrizas exógenas y posiblemente al ser más sensibles a la acción del alpeorujito presentaron un porcentaje de micorrización menor que estas. Por otro lado, el mayor desarrollo de plantas en los tratamientos con suelo estéril respecto a los realizados con suelo no estéril podría indicar que tanto la micorriza indígena como otros factores del suelo podrían influir negativamente en el desarrollo de las plantas a las que se adicionó alpeorujito incubado.

Los efectos fitotóxicos del alpeorujito también se estudiaron en plantas de alfalfa, utilizando similares tratamientos que los realizados en plantas de tomate, considerando además la inoculación de la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4. Los resultados obtenidos en este tipo de planta fueron muy similares a los obtenidos en plantas de tomate en cuanto a resultados comparativos entre tratamientos se refiere, aunque hay que señalar que en suelo no estéril los efectos fitotóxicos del alpeorujito no inoculado fueron mayores que en el resto de tratamientos. La fitotoxicidad del alpeorujito no se vio prácticamente afectada por la incubación con hongos saprobios durante 2 semanas en todos los tratamientos aplicados.

Sin embargo, para tiempos de incubación de 20 semanas, se observó para el tratamiento de suelo no estéril, una disminución generalizada de la fitotoxicidad, exceptuando tres hongos, *Py. cinnabarinus*, *Ph. radiata* y *F. lateritium*; analizando el tratamiento de suelo estéril, se observa una mejora en la disminución del efecto fitotóxico con respecto al tratamiento anterior, sobre todo en aquellos hongos menos efectivos en el descenso de los niveles de fitotoxicidad. El tratamiento con micorriza fue el más efectivo, ya que la incubación del alpeorujito con los hongos saprobios supuso en la mayoría de los casos, un desarrollo de las plantas superior al de plantas sin alpeorujito o control. Por otro lado, cabe destacar que en plantas a las que se adicionó alpeorujito sin incubar, la micorriza no tuvo ningún efecto beneficioso. Estos resultados podrían indicar al igual que lo observado en plantas de tomate que la micorriza supone un efecto beneficioso en el desarrollo de la planta cuando los niveles de fitotoxicidad del alpeorujito adicionados son muy bajos. Por otro lado, la inoculación con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* GR4 aunque supuso un menor desarrollo de la biomasa vegetal, proporcionó un efecto beneficioso en la mejora de la fitotoxicidad del alpeorujito en plantas de alfalfa.

El estudio de la longitud de raíz colonizada mostró en la mayoría de los casos valores superiores de micorrización de los hongos MA indígenas para el tiempo de incubación de veinte semanas. Esto podría estar justificado por el descenso de fenoles que provocaría un descenso de la fitotoxicidad del alpeorujito y un mejor desarrollo de la micorriza. En el caso de micorrizas exógenas, se observaron valores superiores de micorrización al que presentaban las micorrizas indígenas, podríamos justificar este hecho, como lo que se expuso en plantas de tomate, suponiendo que la elevada disminución de fitotoxicidad del alpeorujito vehiculizada por la adición de micorriza exógena habría facilitado y estimulado un mayor desarrollo de ésta.

Los resultados obtenidos muestran comportamientos similares de los dos tipos de plantas a la adición de alpeorujito sin incubar y alpeorujito incubado con diferentes hongos saprobios en los diferentes tratamientos realizados, así como un desarrollo de la micorriza similar atenuado o no por el efecto fitotóxico del alpeorujito.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. El alpeorujo seco y extractado es fitotóxico.
2. El efecto fitotóxico del alpeorujo seco y extractado es variable dependiendo del tipo de planta.
3. Los hongos MA son resistentes a la acción del alpeorujo e incrementan la sensibilidad de plantas inoculadas a la fitotoxicidad de dicho residuo.
4. La fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado es debida fundamentalmente a su contenido fenólico.
5. Los hongos saprobios disminuyeron la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado.
6. Los hongos saprobios son capaces de eliminar los fenoles monoméricos del alpeorujo seco y extractado, particularmente después de 20 semanas de incubación.
7. La incubación del alpeorujo seco y extractado con hongos saprobios incrementó los niveles de lignina polimérica precipitable en ácido (APPL).
8. Uno de los mecanismos por los que los hongos saprobios disminuyen la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado es la producción de enzimas hidrolíticos y ligninolíticos.
9. La inoculación de plantas con hongos MA y *Rhizobium* favoreció la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujo seco y extractado por hongos saprobios.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abela, V., Fernández Serrano, J.M.** 1983. Selección clonal del olivo. *Olea*. 15: 27-30.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S.** 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*. 37: 3897-3904.
- Alba, J., Ruiz, M.A., Hidalgo, F.** 1992. Control de elaboración y características analíticas de los productos obtenidos en una línea continua ecológica. *Dossier Oleo, XII Mostra mercato di olio nuovo*. 2: 43-48.
- Alba, J., Ruiz, M.A., Hidalgo, F., Martínez, F., Moyano, M.J.** 1993. Procesos de elaboración: Nuevas técnicas de extracción. *Dossier Oleo*. 2: 40-59.
- Albanell, E., Plaxats, J., Cabrero, T.** 1988. Chemical changes during vermicomposting of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biol. Fert. Soils*. 6: 266-269.
- Alconada, M.T., Martínez, M.J.** 1994. Purification and characterization of an extracellular endo-1,4-beta-xylanase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 305-310.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H.** 1998. Oxidative biodegradation of phosphorotiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.* 438: 195-200.
- Andrade, G., Mikara, K.L., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J.** 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 192: 71-79.
- Anselmo, A.M., Novais, J.M.** 1992. Biological treatment of phenolic wastes: comparison between free and immobilized cell systems. *Biotechnol. Lett.* 14: 239-244.
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 2004. Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 132-135.
- Archibald, F., Paice, M.G., Jurasek, L.** 1990. Decolourization of kraft bleaching effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Tech.* 12: 846-853.
- Ardon, O., Kerem, Z., Hadar, Y.** 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *J. Biotechnol.* 51: 201-207.

- Arfmann, H.A., Rainer, A.W.** 1990. Microbial reduction of aromatic carboxylic acids. Verlag.Z.Naturforsch. 40: 52-57.
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., Hamdi, M.** 2002. Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. Process Biochem. 38: 361-365.
- Atagana, H.I.** 2004. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. World J. Microb. Biot. 20: 845-849.
- Augé, R.M.** 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza. 11: 3-42.
- Azcón, R., Tobar, R.M.** 1998. Activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in shoot and root of mycorrhizal *Allium cepa*. Effect of drought stress. Plant Sci. 133: 1-8.
- Bagyaraj, D.J.** 1990. Biological interactions between VA-mycorrhizal fungi and other beneficial soil organisms. In: Jalali BL, Chand HJ (eds) Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 February 1990, Haryana Agricultural University, Hisar, India, pp.76-77.
- Bajpai, P.** 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol. Prog. 15: 147-157.
- Bateman, D.F.** 1963. Pectolytic activities of culture filtrates of *Rhizostonia solani* and extract of *Rhizostonia*-infected tissues of bean. Phytopathology. 53: 197-204.
- Benítez, E., Nogales, R., Masciandaro, G., Ceccanti, B.** 2000. Isolation by isoelectric focusing of humic-urease complexes from earthworm (*Eisenia fetida*)-processed sewage sludges. Biol. Fert. Soils. 31: 489-493.
- Berenguer-García, A.** 1978. Selección clonal en olivo. Olea. 7: 7-15.
- Bergabuer, M., Eggert, C., Kraepelin, G.** 1991. Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 105-109.
- Bermek, H., Li, K., Eriksson, K.EL.** 1998. Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp. J. Biotechnol. 66: 117-124.
- Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G.** 1992. Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. SAS Special publication no.54, Madison, Wisconsin.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E.** 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2554-2559.

- Binz, T., Canevascini, G.** 1996. Differential production of extracellular laccase in the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. Mycol. Research. 100: 1060-1064.
- Böhmer, S., Messner, K., Srebotnik, E.** 1998. Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxy-benzotriazole and unsaturated lipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 233-238.
- Bollag, J.M., Shuttleworth, K.L., Anderson, D.H.** 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 54: 3086-3091.
- Bonnin, E., Le Goff, A., Korner, R., Vigouroux, J., Roepstorff, P., Thibault, J.F.** 2002. Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology. 1596: 83-94.
- Boominathan, K., D'Souza, T.M., Naidu, P.S., Dosoretz, C.G., Reddy, C.A.** 1993. Temporal expression of the major lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3946-3950.
- Boominathan, K., Mahadevan, A.** 1989. Dissimilation of aromatic substances by fungi. Zentralblatt Microbiol. 144: 37-45.
- Booth, C.** 1971. The genus *Fusarium*. CMI. Kew, England. pp.273.
- Borja, R., Alba, J., Garrido, S.E., Martínez, L., García, M.P., Monteoliva, M., Ramos-Cormenzana, A.** 1995. Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive mill wastewater. Biotechnol. Appl. Biochem. 22: 233-246.
- Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A.** 2004. Producción de enzimas hidrolíticas por *Aspergillus awamori* sobre orujo de uva. En: Congreso Nacional de Biotecnología, Biotec 2004, Oviedo, España, pp.158.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G.** 1996. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. Tappi J. 79: 199-204.
- Bull, A.T., Chesters, C.G.C.** 1966. The biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. Adv. Enzymol. 28: 325-364.
- Buswell, J.A., Odier, E.** 1987. Lignin Biodegradation. Crc Critical Reviews Biotechnol. 6: 1-60.
- Butt, K.R.** 1993. Utilisation of solid paper mill-sludge and spent brewery yeast as feed for soil-dwelling earthworms. Biores. Technol. 44: 105-107.
- Cabrera, F., Madejon, E., Romero, A.S., López, R.** 2002. Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alperujos. Jornadas de Investigación y transferencia de tecnología al sector oleícola. Córdoba, pp.195-199.

- Camarero, S., Galletti, G.C., Martinez, A.T.** 1994. Preferential Degradation of Phenolic Lignin Units by 2 White-Rot Fungi. *Appl. Environ Microb.* 60: 4509-4516.
- Camurati, F., Lanzani, A., Arpino, A., Ruffo, C., Fedeli, E.** 1984. Le acque di vegetazione dalla lavorazione delle olive: tecnologie ed economie di recupero di sottoprodotti (Vegetation waters from olive processing: technology and economy of by-products recovery). *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse.* 61: 283-292.
- Cantwell, M.I., Peiser, G., Mercado-Silva, E.** 2002. Induction of chilling injury in jicama (*Pachyrhizus erosus*) roots: changes in texture, color and phenolics. *Postharvest Biology and Technology.* 25: 311-320.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F.** 1992a. Isolation, Spectroscopy and Selective Phytotoxic Effects of Polyphenols from Vegetable Waste-Waters. *Phytochemistry.* 31: 4125-4128.
- Capasso, R., Evidente, A., Scognamiglio, F.** 1992b. A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochem. analysis.* 3: 270-275.
- Capasso, R., Evidente, A., Visca, C.** 1994. Production of hydroxytyrosol from olive oil vegetation water. *Agrochimica.* 38: 165-172.
- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L., Sigler, L.** 1980. Genera of Hyphomycetes. Univ. Alberta Press. pp.386.
- Caron, M., Fortín, J.A., Richards, C.** 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersici on tomatoes. *Plant Soil.* 87: 233-239.
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., Lopez, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J.** 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. *Soil Biol.Biochem.* 37: 1131-1140.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Sermanni, G.G., Lo Cascio, B.** 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere.* 50: 959-966.
- Cegarra, J., Paredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., García, D.** 1996. Use of olive mill wastewater compost for crop production. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 38: 193-203.

- Cheilas, T., Stoupis, T., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Mamma, D., Hatzinikolaou, D.G., Kekos, D., Macris, B.J.** 2000. Hemicellulolytic activity of *Fusarium oxysporum* grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinase. *Process Biochem.* 35: 557-561.
- Chen, J., Fales, S.L., Varga, G.A., Royse, D.J.** 1996. Biodegradability of free monomeric and cell-wall bound phenolic acids in maize stover by two strains of white-rot fungi. *J. Sci. Food Agric.* 71: 145-150.
- Chikamatsu, Y., Ando, H., Yamamoto, A., Kyo, S., Yamashita, K., Dojo, K.** 1996. Hydroxytyrosol as melanin formation inhibitor and lipid peroxide formation inhibitor and its application to topical preparations and bath preparations. *Jpn. Patent* 8119825. 1-10.
- Chimi, H., Sadik, A., Letutour, B., Rahani, H.** 1998. Contribution à l'étude des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide caféique et du BHT. *Rev. Fr. Corps Gras.* 35: 339-344.
- Chou, C.H., Patrick, Z.A.** 1976. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *J. Chem. Ecol.* 2: 369-387.
- Christakopoulos, P., Kekos, D., Kolisis, F., Macris, B.J.** 1995. Controlling simultaneous production of endoglucanase and beta-glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged culture. *Biotechnol. Lett.* 17: 883-888.
- Ciavatta, C., Govi, M., Pasoti, L., Sequi, P.** 1993. Changes in organic matter during stabilization of compost from municipal solid wastes. *Biores. Technol.* 42: 141-145.
- Crestini, C., D'Annibale, A., Giovannozzi-Sermanni, G.** 1996. Aqueous plant extracts as stimulators of laccase production in liquid cultures of *Lentinus edodes*. *Biotechnol. Tech.* 10: 243-248.
- Curir, P., Mercuri, A., D'Aquila, F., Pasini, C., Dolci, M.** 1997. Polyphenol oxidase in *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi: partial characterization and activity. *Cereal Res. Commun.* 25: 835-839.
- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M., Marabottini, R.** 2004a. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere.* 54: 887-894.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G.** 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J. Biotech.* 61: 209-218.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quaratino, D., Federici, F., Fenice, M.** 2004b. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research in Microb.* 155: 596-603.

- Dazzo, F.B., Truchet, G.L.** 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membrane Biol.* 73: 1-16.
- De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D., Cervone, F.** 1997. Fungal invasion enzymes and their inhibition. En: *The Mycota V. Plant relationships* (C.Carroll y R.Tudzynski, eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp.61-83.
- Deising, H., Frittrang, A.K., Kunz, S., Mendgen, K.** 1995. Regulation of pectin methylesterase and polygalacturonase lyase activity during differentiation of infection structures in *Uromyces viciae-fabae*. *Microbiology.* 141: 561-571.
- Della Greca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., Temussi, F.** 2001. Phytotoxicity of low-molecular weight phenols from olive-mill waste waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 352-359.
- Díaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W.** 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature.* 338: 579-581.
- Dix, N.J., Webster, J.** 1995. *Fungal Ecology.* Chapman and Hall, England, pp.594.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H.** 1980. *Compendium of Soil Fungi.* Academic Press, London, vol.1, p.859.
- Douds, D.D., Nagahashi, G., Abney, G.D.** 1996. The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. *New Phytol.* 133: 289-294.
- Druet, D., Abbadi, N.E., Comeau, L.C.** 1992. Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from *Penicillium cyclopium* variety. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 745-749.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L.** 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *Febs Letters.* 391: 144-148.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.-E.** 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.
- Ehaliotis, C., Papadopoulou, K., Kotsou, M., Mari, I., Balis, C.** 1999. Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microb. Ecol.* 30: 301-311.
- Eivazi, F., Weir, C.C.** 1989. Phosphorus and mycorrhizal interaction on uptake of P and trace elements by maize. *Fertilize Research.* 21: 19-22.

- Elisashvili, V.I., Daushvili, L.P., Zakariashvili, N.G., Kachlishvili, E.T., Kiknadze, M.O., Tusishvili, K.A.** 1998. Effect of supplementary carbon sources and exogenous phenolic compounds on the lignocellulolytic system of *Cerrena unicolor* during the solid-state fermentation of grapevine cutting wastes. *Microb.(Moscow)*. 67: 33-37.
- Ellis, M.B.** 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI. Kew, England. pp.608.
- Elmholt, S., Kholler, A.** 1987. Measurement of the length of fungal hyphae by the membrane filter technique as a method for comparing fungal occurrence in cultivated field soils. *Soil Biol. Biochem.* 19: 679-682.
- Elvira, C., Sampedro, L., Benítez, E., Nogales, R.** 1998. Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: A pilot scale study. *Biores.Technol.* 63: 211-218.
- Esterbauer, H.** 1988. Role of antioxidants in preventing the oxidation of LDL, in the molecular mechanisms of aging: The role of dietary lipids. 1 st Medical Scientific Meeting. Lucca.
- Fadiloglu, S., Soylemez, Z.** 1997. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. *Food Res. In.* 30: 171-175.
- Fahr, K., Wetzstein, H.G., Grey, R., Schlosser, D.** 1999. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 175: 127-132.
- Felizón, B., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A., Guillén, A.** 2000. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 15-22.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J.P.** 2001. Basidiomycetous yeasts. In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A.(Eds.), *The Mycota VII Part B Systematics and Evolution*, Springer-Verlag, Berlín, pp.3-35.
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillén, A., Heredia, A.** 1998. Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1-7.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A.** 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two phase olive oil processing or "alperujo". *J. Agric. Food Chem.* 50: 6804-6811.
- Field, J.A., De Jong, E., Feijoo-Costa, G., De Bont, J.A.M.** 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 11: 44-49.
- Field, J.A., Lettinga, G.** 1991. Treatment and detoxification of aqueous spruce bark extracts by *Aspergillus niger*. *Water Sci. Technol.* 24: 127-137.

- Fiestas Ros de Ursinos, J.A.** 1986. Vegetation water used as fertilizer. In: FAO, (Ed.), International Symposium on Olive by Products Valorization, Sevilla, Spain, pp.321-330.
- Filippi, C., Bedini, S., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Saviozzi, A.** 2002. Cocomposting of olive mill by-products: chemical and microbiological evaluations. *Comp. Sci. Util.* 10: 63-71.
- Finlay, R., Soderstrom, B.** 1992. Mycorrhiza and carbon flow to the soil. En: Mycorrhizal functioning (M.Allen, eds.) Chapman and Hall, New York, pp. 134-160.
- Fortín, J.A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A.P., Piché, Y.** 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can. J. Bot.* 80: 1-20.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G., Lyberatos, G.** 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 36: 4735-4744.
- Fries, L.L.M., Pacovsky, R.S., Safir, G.R., Siqueira, J.O.** 1997. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *J. Chem. Ecol.* 23: 1755-1767.
- Fry, S.C., Miller, J.G.** 1989. Toward a working model of the growing plant cell wall: phenolic cross-linking reactions in the primary cell walls of dicotyledons. In: NG Lewis, MG Paice, eds, The biosynthesis and biodegradation of plant cell wall polymers, American Chemical Society, Washington DC, pp. 33-46.
- Galli, C., Visioli, F.** 1999. Antioxidant and other properties of phenolics in olives/olive oil, typical compounds of the mediterranean diet. *Lipids.* 34: S23-S26.
- García-Garrido, J.M., Garcia-Romera, I., Ocampo, J.A.** 1992a. Cellulase activity in lettuce and onion plants colonized by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Soil Biol. Biochem.* 25: 503-504.
- García-Garrido, J.M., GarciaRomera, I., Ocampo, J.A.** 1992b. Cellulase production by the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol and Gerd) Gerd and Trappe. *New Phytologist.* 121: 221-226.
- García-Gomez, A., Roig, A., Bernal, M.P.** 2003. Composting of the soil fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technol.* 86: 59-64.
- García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Martínez-Molina, E., Ocampo, J.A.** 1991a. Production of pectolytic enzymes in lettuce root colonized by *Glomus mosseae*. *Soil Biol. Biochem.* 23: 597-601.

- García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A.** 1991b. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. FEMS Microbiol. Lett. 78: 343-346.
- Gaur, A., Adholeya, A.** 2002. Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. Biol. Fert. Soils. 35: 214-218.
- Gaynor, J.D.** 1992. Microbial hydrolysis of diclofop-methyl in soil. Soil Biol. Biochem. 24: 29-32.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M.** 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Biomediat. J. 3: 1-26.
- Gianinazzi-Pearson, V.** 1994. Morphofunctional compatibility in interactions between roots and arbuscular endomycorrhizal fungi: molecular mechanisms, genes expression. In: kihmito specificity in plant diseases: histological, genetic, biochemical and molecular basis. Oxford: Pergamon Press, UK, 251-263.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E.** 1993. Physiology of mycorrhizal mycelia. Ad. Plant Pathol. 9: 55-82.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S.E., Gianinazzi, S., Smith, F.A.** 1991. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V: Is H⁺ ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? New Phytol. 117: 61-74.
- Giannoutsou, E.P., Meintanis, C., Karagouni, A.D.** 2004. Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. Bioresource Technol. 93: 301-306.
- Giovannetti, M., Citernesi, A.S.** 1993. Time-course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. Mycol. Res. 97: 1140-1142.
- Giovannetti, M., Gianinazzi-Pearson, V.** 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. Mycol. Res. 98: 705-715.
- Giovannozzi-Sermanni, G., D'Annibale, A., Di Lena, G., Vitale, N.S., Di Mattia, E., Minelli, V.** 1994. The production of exoenzymes by *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. Bioresource Technol. 48: 173-178.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L., Gold, M.H.** 1986. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 251: 688-696.
- Goering, H.K., Gordon, C.H., Hemken, R.W., Vansoest, P.J., Smith, L.W.** 1970. Analytical Measures of Heat Damaged Forage and Nitrogen Digestibility. J. of Dairy Science. 53: 676.

- Gomez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Barzana, E.** 1988. Utilization of endopolygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. *J. Food Sci.* 53: 1236-1240.
- Goupy, P., Fleuriet, A.** 1986. Caractéristique du brunissement enzymatique de l'olive. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols.* 13: 455-457.
- Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K.D., Gunther, T., Fritsche, W.** 1999. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol. Research.* 103: 1009-1018.
- Graystone, S.J., Campbell, C.D.** 1996. Funcional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology.* Victoria, Canadá. 16: 1031-1038.
- Grey, R., Hofer, C., Schlosser, D.** 1998. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *J. Basic Microbiol.* 38: 371-382.
- Haddadin, M.S., Al Natour, R., Al Qsous, S., Robinson, R.K.** 2002. Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresource Technol.* 82: 131-137.
- Hamdi, M., García, J.L., Ellouz, R.** 1992. Integrated biological process for olive mill wastewaters treatment. *Bioprocess Eng.* 8: 79-
- Hamman, O.B., De la Rubia, T., Martínez, J.** 1999. Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavido-alba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 2410-2415.
- Hart, H.E., Parish, M.E., Burns, J.K., Wicker, L.** 1991. Orange finisher pulp as a substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *J. Food Sci.* 56: 480-483.
- Hartung, A.C., Nair, M.G., Putnam, A.R.** 1990. Isolation and characterization of phytotoxic compounds from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) roots. *J. Chem. Ecol.* 16: 1707-1718.
- Have, R., Teunissen, P.J.M.** 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101: 3397-3413.
- Hawkins, H.J., George, E.** 1999. Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake. *Physiol. Plant.* 105: 694-700.
- Hayano, K., Tubaki, K.** 1985. Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biol. Biochem.* 17: 553-557.

- Hayashi, T., Maclachlan, G.** 1984. Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization. *Plant Physiol.* 75: 596-604.
- Hayashi, T., Marsden, M.P.F., Delmer, D.P.** 1987. Pea xyloglucan and cellulose V. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiol.* 83: 384-389.
- Heinzkill, M., Messner, K.** 1997. The ligninolytic system of fungi. In: *Fungal Biotechnology*, ed. Anke, T., pp.213-227. Weinheim: Chapman & Hall. ISBN: 3-8261-0090-5.
- Hermoso, M., González, J., Uceda, M., García-Ortíz, A., Morales, J., Frías, L., Fernández, A.** 1994. Elaboración de aceites de oliva de calidad. Apuntes 11/94. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla.
- Hewitt, E.J.** 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition *Tech. Commun.* n 22, Farnham Royal, Commonwealth Agriculture Bureau, Bucks. Gran Bretaña. pp. 547
- Hill, G.A., Robinson, C.W.** 1975. Substrate inhibition kinetics: phenols degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 1599-
- Hofrichter, M., Fritsche, W.** 1996. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank-coal-depolymerizing activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 220-225.
- Humanes, G.J., Lamas, J.F., Borrero, P.F.** 1967. Selección de nuevas variedades de olivo. *Portug. acta biol.* 10: 185-194.
- Ichinose, H., Wariishi, H., Tanaka, H.** 1999. Bioconversion of recalcitrant 4-methylthiophene to water-extractable products using lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Progress.* 15: 706-714.
- Iyo, A.H., Antai, S.P.** 1988. Effects of different nitrogen sources on lignocellulose degradation and APPL production. *Lett. Appl. Microbiol.* 7: 75-78.
- Jaeger, K.E., Steinbüchel, A., Jendrossek, D.** 1995. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly (w-hydroxyalkanoates). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3118
- Jakobsen, I.** 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. En: *Mycorrhiza, structure, function, molecular biology and biotechnology.* (A. Varma y B. Hock, eds) Springer-Verlag, Berlín. pp.297-324.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M., Penninckx, M.J.** 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 802-809.

- Jarstfer, A.G., Sylvia, D.M.** 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Soil Microbial Ecology: Applications in Agriculture and Environmental Management (B.Metting, ed.) Marcel Dekker, New York. pp.349-377.
- Jecu, L.** 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Ind. Crops Products. 11: 1-5.
- Jeffries, P.** 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. Can. J. Bot. 73: 1284-1290.
- Jeffries, P., Barea, J.M.** 2001. Arbuscular mycorrhiza-A key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: B.Hock (ed.) The Mycota, Vol.IX: Fungal Associations. Springer-Verlag, Berlín, pp.95-113.
- Jeffries, P., Dodd, J.C.** 1996. Functional ecology of mycorrhizal fungi in sustainable soil-plant systems. In: Azcón-Aguilar C., Barea J.M. (eds) Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development. European Commission. Brussels, pp.497-501.
- Jensen, K.A., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E., Hammel, K.E.** 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3679-3686.
- Johansen, A., Jakobsen, I., Jensen, E.S.** 1994. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. Plant Soil. 160: 1-9.
- Karapinar, M., Worgan, M.J.T.** 1983. Bioprotein production from the waste products of olive oil extraction. J. Chem. Technol. Biotech. 33: 185-188.
- Keum, Y.S., Li, Q.X.** 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. Chemosphere. 56: 23-30.
- Keys, A.** 1970. Coronary heart disease in seven countries. Circulation. 1: 1-121.
- Khalil, A.I.** 2002. Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from the ligninolytic white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse. World J. Microb. Biot. 18: 753-759.
- Khan, A.G.** 1993. Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. Mycorrhiza. 3: 31-38.
- Kim, J., Shoda, M.** 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1029-1035.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L.** 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41: 465-505.

- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G.** 2001. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *App. Microb. Biotechnol.* 57: 221-226.
- Kluczek-Turpeinen, B., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M.** 2003. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *App. Microb. Biotechnol.* 61: 374-379.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Baldi, D., Angrisani, R., Suzzi, G., Mastrocola, D., Guerzoni, M.E.** 2005. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Biores. Technol.* 96: 317-322.
- Leadir, L., Fries, M., Pacovsky, R.S., Safir, G.R., Siqueira, J.O.** 1997. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *J. Chem. Ecol.* 23: 1755-1767.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J.L., Asther, M., Labat, M.** 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.* 75: 501-507.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K.** 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza.* 7: 139-153.
- Li, H.H., Inoue, M., Nishimura, H., Mizutani, J., Tsuzuki, E.** 1993. Interactions of trans-sinamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *J. Chem. Ecol.* 19
- Linares, A., Caba, J.M., Ligeró, F., De la Rubia, T., Martínez, J.** 2001. Eliminación de los efectos fitotóxicos de los residuos de las almazaras por *Phanerochaete flavidobrunnea*. In: I Encuentro Internacional Gestión de residuos orgánicos en el ámbito rural mediterráneo, 22-23 Febrero, Pamplona (España).
- Linares, A., Caba, J.M., Ligeró, F., De la Rubia, T., Martínez, J.** 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavidobrunnea*. *Chemosphere.* 51: 887-891.
- Linderman, R.G.** 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: Bethlenfalvay G.J., Linderman R.G. (eds) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. (ASA special publication) ASA, Madison, Wis., pp 45-70.
- Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Dorika, L.J., Veliky, I.K.** 1983. Removal of color from kraft mill waste waters with culture of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2055-2065.

- Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M., Veliky, I.A.** 1981. Decolorization of a kraft mill effluent with fungal mycelium immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnol. Lett.* 3: 701-706.
- Lynch, J.M., Bragg, E.** 1985. Microorganisms and soil aggregate stability. *Ad. Soil Sci.* 2: 133-171.
- M.A.P.A.** 1986. Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, productos fitosanitarios y fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Madejon, E., Galli, E., Tomati, U.** 1998. Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica.* 48: 135-146.
- Madrid, F., De la Rubia, T., Martínez, J.** 1996. Effect of *Phanerochaete flavidio-alba* on aromatic acids in olive mill waste waters. *Tech. Environ. Chem.* 51: 161-168.
- Maestro-Durán, R., León-Cabello, R., Ruiz-Gutierrez, V., Fiestas, P., Vazquez-Roncero, A.** 1994. Bitter phenolic glucosides from seeds of olive (*Olea europea*). *Grasas y Aceites.* 45: 332-335.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttermann, A.** 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Micro. Technol.* 22: 335-341.
- Mandee, Q., Baker, R.** 1991. Mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strain of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology.* 81: 462-469.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciola, V., Montedoro, G., Zappia, V.** 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.* 10: 159-165.
- Marsilio, V., Di Giovacchino, L., Solinas, M., Lombardo, N., Briccoli-Bati, C.** 1990. First observations on the disposal effects of olive oil mills vegetation waters on cultivated soil. *Acta Horticulturae.* 286: 493-496.
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., Sannia, G.** 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 30: 1914-1918.
- Mataix, J.** 1994. El aceite de oliva en la dieta mediterránea. *Fruticultura Profesional (Suplemento).* 62: 129-134.
- Mayer, A.M., Evenari, M.** 1952. The relation between the structure coumarin and its derivatives and their activity as germination inhibitors. *J. Exp. Bot.* 3: 246-252.
- Mayer, A.M., Evenari, M.** 1953. The activity of organic acids as germination inhibitors and its relation to pH. *J. Exp. Bot.* 4: 256-263.

- McAllister, C.B., Garcia-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J.A.** 1994. Interaction between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effect on plant growth, arbuscular mycorrhizas and saprophytic population. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1363-1367.
- Medeci, F., Merli, C., Spagnoli, E.** 1985. Anaerobic digestion of olive mill wastewater: a new process. Anaerobic digestion and carbohydrates hydrolysis of waste. Ferranti, H., Ferrero, M.P. and Vaveau H., Elsevier Publ., London. 385-398.
- Mendgen, K., Deising, H.** 1993. Infection structures of fungal plant pathogens-acytological and physiological evaluation. *New Phytol.* 124: 193-213.
- Mendonca, E., Martins, A., Anselmo, A.M.** 2004. Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. *Electron .J. Biotechnol.* 7: 30-37.
- Mochizuki, M., Hirano, M., Kanmuri, Y., Kudo, K., Tokiwa, Y.** 1995. Hydrolysis of polycaprolactone by lipase: effects of draw ratio on enzymatic degradation. *J. Appl. Polymer. Sci.* 55: 289-296.
- Monteoliva-Sanchez, M., Incerti, C., Ramos-Cormenzana, A., Paredes, C., Roig, A., Cegarra, J.** 1996. The study of the aerobic bacterial microbiota and the biotoxicity in various samples of olive mill wastewaters (alpechín) during their composting process. *Int. Biodeter. Biodegr.* 211-214.
- Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Cormenzana, A.** 1990. Antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills. In *Encyclopedia of Environmental Control Technology* 731-757. Ed.P.N.Chereisinoff.Gulf Publishing Co., Houston.
- Moreno, R., Benítez, E., Melgar, R., Polo, A., Gómez, M., Nogales, R.** 2000. Vermicomposting as an alternative for reusing by-products from the olive oil industry. *Fresenius Environ. Bull.* 9: 1-8.
- Morettini, A.** 1954. Mutazioni gemmarie nell'olivo e loro applicazione per il miglioramento della coltura. *Italia Agricola.* 91: 197-204.
- Morrison, W.H., Mulder, M.M.** 1994. Pyrolysis mass spectrometry and pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of ester- and ether- linked phenolic acids in coastal Bermudagrass cell walls. *Phytochem.* 35: 1143-1151.
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T.** 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell.* 7: 869-885.
- Nadian, H., Smith, S., Alston, A.M., Murray, R.S.** 1996. The effect of soil compaction on growth and P uptake by *Trifolium subterraneum*: interactions with mycorrhizal colonization. *Plant Soil.* 182: 39-49.

- Nannipieri, P., Greco, S., Ceccanti, B.** 1990. Ecological significance of biological activity in soil. In: Soil Biochemistry (Bollag, J.M.& Stotzky, G., eds), Marcel Dekker inc., New York Basel, Vol.6, pp. 255-293.
- Nannipieri, P., Pedrazzani, F., Arcara, P.G., Piovanelli, C.** 1979. Changes in amino acids, enzyme activities and biomasses during soil microbial growth. *Soil Sci.* 127: 26-34.
- Nazareth, S., Mavinkurve, S.** 1986. Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Can. J. Microbiol.* 32: 494-497.
- Nelson, N.** 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucosa. *J. Biol. Biochem.* 153: 375-380.
- Nelson, S.D., Khan, S.U.** 1990. The role of *Glomus mycorrhizae* in determining the fate of atrazine in soil and corn plants. Abstracts of the Eighth North American Conference on Mycorrhize, Wyoming. p. 222.
- Nishitani, K., Tominaga, R.** 1991. In vitro molecular weight decrease in xyloglucans by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis*. *Physiol. Plant.* 82: 490-497.
- Nogales, R., Elvira, C., Benítez, E., Thompson, R., Gómez, M.** 1999a. Feasibility of vermicomposting dairy biosolids using a modified system to avoid earthworm mortality. *J. Environ. Sci. Heal.B.* 34: 151-169.
- Nogales, R., Melgar, R., Guerrero, A., Losada, G., Benítez, E., Thompson, R., Gomez, M.** 1999b. Growth and reproduction of *Eisenia andrei* in dry olive caje mixed with other organic wastes. *Pedobiol.* 43: 744-752.
- Ocampo, J.A.** 1993. Pesticide-plant pathogen interactions in crop production: beneficial and deleterious effects. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 214-226.
- Ocampo, J.A., Barea, J.M.** 1985. Effect of carbamate herbicides on VA mycorrhizal infection and plant growth. *Plant Soil.* 85: 375-383.
- Ocampo, J.A., Barea, J.M., Montoya, E.** 1975. Interaction between *Azotobacter* and phosphobacteria and their establishment in the rhizosphere as affected by soil fertility. *Can. J. Microbiol.* 21: 1160-1165.
- Ohnishi, K., Yoshida, Y., Sekiguchi, J.** 1994. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 490-495.
- Ohta, M., Higuchi, T., Shojiro, I.** 1979. Microbial degradation of dehydrodiconiferil alcohol, a lignin substructure model. *Arch. Microbiol.* 121: 23-28.

- Okeke, B.C., Paterson, A., Smith, J.E., Watson-Craik, I.A. 1994. Relationships between ligninolytic activities of *Lentinula* spp and biotransformation of pentachlorophenol in sterile soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 284-287.
- Palliotti, A., Proietti, P. 1992. Ulteriori indagini sull'influenza delle acque reflue di frantoi oleari sull'olivo. *L'Informatore Agrario.* 39: 72-76.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P. 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Ind. Crops Products.* 18: 37-45.
- Pankhurst, C.E., Hawke, B.G., McDonald, H.J., Kirkby, C.A., Buckerfield, J.C., Michelsen, P., O'Brien, K.A., Gupta, V.V.S.R., Doube, B.M. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Aust. J. Exp. Agr.* 35: 1015-1028.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Cegarra, J., Roig, A. 2002. Biodegradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agriculture wastes. *Biores. Technol.* 85: 1-8.
- Paredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J. 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fert. Soils.* 32: 222-227.
- Patino, B., Posada, M.L., Gonzalez-Jaen, M.T., Vazquez, C. 1997. The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. *Microbios.* 91: 47-54.
- Pérez, J., Hernández, M.T., Ramos-Cormenzana, A., Martínez, J. 1987. Caracterización de fenoles del pigmento del alpechín y transformación por *Phanerochaete chrysosporium*. *Grasas y Aceites.* 38: 367-371.
- Périé, F.H., Gold, M.H. 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2240-2245.
- Perrin, J.L. 1992. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son fruit. *Revue Française des Corps Gras.* 39: 25-32.
- Petrovic, S.E., Skrinjar, M., Becarevic, A., Vujicic, J.F., Banka, L. 1990. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 12: 299-304.
- Piperidou, C.I., Chaidou, C.I., Stalikas, C.D., Soulti, K., Pilidis, G.A., Balis, C. 2000. Bioremediation of olive oil mill wastewater: Chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1941-1948.
- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.

- Pometto, A.L., Crawford, D.L.** 1986. Catabolic Fate of *Streptomyces-Viridosporus* T7A-Produced, Acid-Precipitable Polymeric Lignin Upon Incubation with Ligninolytic *Streptomyces* Species and *Phanerochaete-Chrysosporium*. *App. Environ. Microb.* 51: 171-179.
- Proietti, P., Palliotti, A., Tombesi, A., Cenci, G.** 1995. Chemical and microbiological modifications of two different cultivated soils induced by olive oil waste water administration. *Agricoltura Mediterranea.* 125: 160-171.
- Radford, A., Stone, P.J., Taleb, F.** 1996. Cellulase and amylase complexes. En: *The Mycota III. Biochemistry and molecular biology* (R. Brambl y G.A. Marzluf, eds.) Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg. pp. 269-294.
- Ragazzi, E., Veronesi, G.** 1967. Ricerche sui costituenti idrosolubili delle olive I. Zuccheri e fenoli. *Ann. Chim.* 57: 1476-1486.
- Rallo, L., Nahalawi, N.** 1976. Situación y perspectivas sobre la utilización y selección de patrones en olivo. *Olea.* 4: 7-27.
- Ramos, J.L., Timmis, K.N.** 1987. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microb. Sci.* 4: 228-237.
- Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E.** 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science.* 289: 1920-1921.
- Redgwell, R.J., Melton, L.D., Brasch, D.J.** 1991. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): effect of ripening on the structural features of cell-wall materials. *Carbohydr. Res.* 209: 191-202.
- Regalado, V., Perestelo, F., Rodríguez, A., Carnicero, A., Sosa, F.J., De la Fuente, G., Falcon, M.A.** 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *App. Microb. Biotechnol.* 51: 388-390.
- Regalado, V., Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., De la Fuente, G., Falcon, M.A.** 1997. Lignin degradation and modification by the soil-inhabiting fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3716-3718.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H.** 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11841-11843.
- Rice, R.G.** 1981. Ozone treatment of hazardous materials. *AIChE Symp. Series.* 77: 79-107.
- Ridout, C.J., Coley-Smith, J.R., Lynch, J.M.** 1986. Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2345-2352.
- Rifai, M.A.** 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers.* 116: 1-56.

- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Pera, A., De Bertolid, M.** 1986. Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analysis. *Waste Manag. Res.* 4: 387-396.
- Rodríguez, A., Perestelo, F., Carnicero, A., Regalado, V., Perez, R., De la Fuente, G., Falcon, M.A.** 1996. Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 213-219.
- Rodríguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R.** 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38: 27-32.
- Rodríguez, M., Perez, J., Ramos, A., Martinez, J.** 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill wastewaters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 219-
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A.** 1991a. Influence of aromatic compounds and lignin on production of ligninolytic enzymes by *Phlebia radiata*. *Phytochemistry.* 30: 2869-2872.
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A.** 1991b. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiol. Pol.* 40: 221-234.
- Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A.** 2002. Hydroxytyrosol-beta-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3935-3939.
- Ryan, D., Robarts, K.** 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst.* 123: 31R-44R.
- Sanders, F.E., Sheikh, N.A.** 1983. The development of vesicular arbuscular mycorrhizal infection in plant root systems. *Plant Soil.* 71: 223-346.
- Santos, V.L., Linardi, V.R.** 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potential. *Process Biochem.* 39: 1001-1006.
- Saparrat, M.C.N., Martinez, M.J., Tournier, H.A., Cabello, M.N., Arambarri, A.M.** 2000. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrata. *World J. Microb. Biotechnol.* 16: 799-803.
- Sarkanen, S.** 1991. Enzymatic lignin degradation, an extra-curricular view. *ACS Symp. Ser.* 460: 247-269.
- Saviozzi, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Scagnozzi, A., Vanni, G.** 1993. Decomposition of vegetation-water sludge in soil. *Biores. Technol.* 44: 223-228.

- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., Aloui, F.** 2000. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochem.* 35: 725-735.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1992. Decolourization of olive mill waste-waters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of lignin degrading system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 813-817.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1993. Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-water. *J. Chem. Technol. Biotech.* 57: 141-146.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1995. Role of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1098-1103.
- Scheibner, K., Hofrichter, M., Fritsche, W.** 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nemalotoma frowardii* b19. *Biotechnol. Lett.* 19: 835-839.
- Schoemaker, H.E., Tuor, U., Muheim, A., Schmidt, H.W.H., Leisola, M.S.A.** 1991. White-rot degradation of lignin and xenobiotics. In *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*, ed. Betts, W.B., pp.157-174. Berlin: Springer-Verlag. ISBN: 3-540-19705-2.
- Schübler, A., Schwarzott, D., Walker, C.** 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413-1421.
- Schwarzott, D., Walker, C., Schübler, A.** 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Mol. Phylogenetic Evol.* 21: 190-197.
- Senesi, N., Brunetti, G.** 1996. Chemical and physico-chemical parameters for quality evaluation of humic substances produced during composting. In: De Bertoldi, M., Sequi, P., Lemmes, B., Papi, T.(Eds.), *The Science of Composting*. Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, Glasgow.
- Siqueira, J.O., Brown, D.G., Safir, G.R., Nair, M.G.** 1992. Field application of the VAM stimulating isoflavonoid formononetin on corn and soybean in Brazil. *The International Symposium of Management of Mycorrhizae*, University of Western Australia, Perth, p.132.
- Siqueira, J.O., Safir, G.R., Nair, M.G.** 1991a. Stimulation of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Formation and Growth of White Clover by Flavonoid Compounds. *New Phytologist.* 118: 87-93.
- Siqueira, J.O., Safir, G.R., Nair, M.G.** 1991b. Va-Mycorrhizae and Mycorrhiza Stimulating Isoflavonoid Compounds Reduce Plant Herbicide Injury. *Plant Soil.* 134: 233-242.
- Smith, S.E., Read, D.J.** 1997a. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego.

- Smith, S.E., Read, D.J.** 1997b. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic Press, London, UK.
- Solinas, M.** 1990. Qualità merceologica degli oli vergini di oliva. Riv. Merceologia. 29: 189-221.
- Sugiura, M.** 1984. Bacterial lipases. In: Borgström B., Brockman H.L., editors. Lipases. Amsterdam: Elsevier, pp. 505-523.
- Szklarz, G.D., Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L., Linkins, A.E.** 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycologia. 81: 234-240.
- Talbott, L.D., Ray, P.M.** 1992. Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides: effects of auxin and turgor. Plant Physiol. 98: 369-379.
- Thurston, C.F.** 1994. The Structure and Function of Fungal Laccases. Microbiology-Uk. 140: 19-26.
- Titus, J.H., Titus, P.J., Nowak, R.S., Smith, S.D.** 2002. Arbuscular mycorrhizae of Mojave Desert plants. Western N. Amer. Naturalist. 62: 327-334.
- Tomati, U., Galli, E., Dilella, G., Buffone, R.** 1991. Induction of Laccase in *Pleurotus Ostreatus* Mycelium Grown in Olive Oil Waste-Waters. Agrochimica. 35: 275-279.
- Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L., Volterra, E.** 1995. Bioremediation of Olive-Mill Wastewaters by Composting. Waste Manage. Res. 13: 509-518.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggelis, G.** 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. Bioresource Technol. 84: 251-257.
- Uceda, M.** 1994. L'olivicoltura in Spagna. VII Corso Internazionale per il Miglioramento della Qualità dell'Olivo di Oliva. Lecce (Italia).
- Uceda, M., Hermoso, M., González, J.** 1995. Evolución de la tecnología del aceite de oliva, nuevos sistemas ecológicos, ensayos y conclusiones. Alimentación, Equipos y Tecnología. 5: 93-98.
- Varga, M., Köves, E.** 1959. Phenolic acids as growth and germination inhibitors in dry fruits. Nature (Lond). 183: 401-
- Verhe, R., Papadopoulos, G., Boskou, D.** 1992. Preparation of hydroxytyrosol. Bull. Liason Groupe Polyphenols. 15: 237-244.
- Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Dellemonache, G., Sermanni, G.G.** 1995. Correlated Effects During the Bioconversion of Waste Olive Waters by *Lentinus-Edodes*. Bioresource Technol. 51: 221-226.

- Visioli, F., Galli, C.** 1995. Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: the potential role of olive oil and its minor constituents. *Nutr. Metabol. Cardiovasc.Dis.* 5: 306-314.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F.F., Galli, C.** 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agr. Food Chem.* 47: 3397-3401.
- Visioli, F., Vincieri, F.F., Galli, C.** 1995. Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia.* 51: 32-34.
- Vitolo, S., Petarca, L., Bresci, B.** 1999. Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource Technol.* 67: 129-137.
- Vivas, A., Vörös, I., Biró, B., Campos, E., Barea, J.M., Azcon, R.** 2003. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus brevis* isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environ. Pollution.* 126: 179-189.
- Vlyssides, A.G., Loizidou, M., Zorpas, A.A.** 1999. Characteristics of solid residues from olive oil processing as bulking material for co-composting with industrial wastewater. *J. Environ. Sci. Heal.A.* 34: 727-748.
- Von Arx, J.A.** 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. *J. Cramer, Vaduz.* pp. 424.
- Wacker, T.L., Safir, G.R., Stephens, C.T.** 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth on asparagus (*Asparagus officinalis*). *J. Chem. Ecol.* 16: 901-909.
- Wang, T.S.C., Yang, T.K., Chuang, T.T.** 1967. Soil Phenolic Acids As Plant Growth Inhibitors. *Soil Science.* 103: 239.
- Wang, X., Sun, C., Wang, Y., Wang, L.** 2002a. Quantitative structure-activity relationships for the inhibition toxicity to root elongation of *Cucumis sativus* of selected phenols and interspecies correlation with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere.* 46: 153-161.
- Wang, X., Wang, Y., Chunsheng, Y., Wang, L., Han, S.** 2002b. Mechanism-based quantitative structure-phytotoxicity relationships comparative inhibition of substituted phenols on root elongation of *cucumis sativus*. *Arch. Env. Con. Tox.* 42: 29-35.
- Whitehead, L.F., Day, D.A.** 1997. The peribacteroid membrane. *Physiol. Plant.* 100: 30-44.
- Widden, P., Bisset, J.** 1972. An automatic multichamber soil washing apparatus for removing fungal spores from soil. *Can. J. Microbiol.* 18: 1399-1404.

- Xiao, Z.Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N.** 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113: 1115-1126.
- Yadav, J.S., Reddy, C.A.** 1992. Non-involvement of lignin peroxidases and manganese peroxidases in 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Lett.* 14: 1089-1092.
- Yanai, R.D., Fahey, T.J., Miller, S.L.** 1995. Efficiency of nutrient acquisition by fine roots and mycorrhizae. In *Resource Physiology of Conifers: Acquisition, Allocation and Utilization*, Smith WK, Hinckley TM (eds). Academic Press: London. 75-103.
- Zhang, D., Quantick, P.C., Grigor, J.M.** 2000. Changes in phenolic compounds in Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 19: 165-172.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M.** 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle.* 22: 54-527.

