



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

**Fraccionamiento físico del alpeorujo como base para
desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y
arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad**

**Elisabet Aranda Ballesteros
2006**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Elizabet Aranda Ballesteros
D.L.: Gr. 2099 - 2006
ISBN: 84-338-4127-0

Fraccionamiento físico del alpeorujó como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad.

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas
Elisabet Aranda Ballesteros
para aspirar al grado de Doctora

Fdo: Elisabet Aranda Ballesteros

VºBº
Los directores

Fdo: Dª Inmaculada García Romera
Doctora en Ciencias Biológicas
Investigador Científico del C.S.I.C

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

Universidad de Granada 2006

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 Ciencia y Tecnología asociada al proyecto AGL2001-1876 (FPI, Junio 2002). Durante el período de disfrute de dicha beca se realizaron dos estancias breves gracias a ayudas del MCYT en el Departamento de Ciencias del Suelo, de la Planta y del Medio Ambiente de la “Università degli Studi di Napoli Federico II” de Nápoles (Italia), y en el Centro de Espectrometría de Masas Proteómica y Biomolecular del “Istituto di Scienze dell’Alimentazione”, CNR, en Avellino (Italia) bajo la supervisión de los Doctores Renato Capasso y Antonio Malorni. Parte de los resultados presentados en esta tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

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

E. Aranda, I. Sampedro, I. García-Romera, J. A. Ocampo. 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 132-135.

E. Aranda, I. García-Romera, J.A. Ocampo, V. Carbone, A. Malorni, F. Sannino, A. De Martino, R. Capasso 2006. Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residues by saprobe fungi. *Chemosphere* (En prensa).

E. Aranda, I. Sampedro, J.A. Ocampo, I. García-Romera. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white rot fungi and its impact on tomato plant growth. *International Biodeterioration and Biodegradation* (En prensa)

E. Aranda, I. Sampedro, R. Díaz, P.A. García, J.A. Ocampo, I. García-Romera. Dry matter and root colonization of plants by arbuscular mycorrhizal fungi in presence of physical fractions of dry olive residue. *Applied Soil Ecology* (Enviado a publicar).

E. Aranda, I. García-Romera, J.A. Ocampo, V. Carbone, A. Mari, A. Malorni, F. Sannino, A. De Martino, R. Capasso. Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and biorremediated components of dry olive mill residue. *Chemosphere* (Enviado a publicar).

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

- Jornadas sobre Resultados de Actividades de Investigación y Transferencia de Tecnología del Programa de Mejora de la Calidad de la Producción del Aceite de Oliva (Córdoba, Noviembre de 2002).
- XI Symposium Científico-Técnico de EXPOLIVA 2003 (Jaén, Mayo de 2003).
- 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).
- Feria Internacional del aceite de oliva e industrias afines. EXPOLIVA 2005 (Jaén, Mayo de 2005).
- 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (Madrid, Septiembre de 2005).
- 5th International Conference on Mycorrhiza (Granada, Julio de 2006).
- IX Congreso Nacional de Micología. Symposium sobre micromicetos: Diversidad, Ecología y Usos. (Ensenada, Méjico, Octubre de 2006).

¿Cómo compaginar
la aniquiladora
idea de la muerte
con ese incontenible
afán de vida?

¿cómo acoplar el horror
ante la nada que vendrá
con la invasora alegría
del amor provisional
y verdadero?

¿cómo desactivar la lápida con el sembradío?

¿la guadaña
con el clavel?

¿será que el hombre es eso?
¿esa batalla?

Mario Benedetti



A mi familia y amigos

Agradecimientos

Como supongo que les ocurre a todas las personas que llegan a algún momento esperado importante en sus vidas, me parece increíble haber llegado hasta aquí y es cuando pienso en todas aquellas personas que me han ayudado a que este momento llegue. Por ello me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que lo han hecho posible:

En primer lugar me gustaría agradecerles a mis directores de tesis la Dra. Inmaculada García y el Dr. Juan Antonio Ocampo por todo lo que habéis hecho por mí y a todo el laboratorio al que considero un grupo excepcional y cercano en el que da gusto trabajar.

A Inma, por tantísimas cosas... para empezar por haberme ofrecido esta oportunidad, porque de lo contrario nada de esto estaría sucediendo, por demostrarme cada día tu esfuerzo, ayuda y tu disponibilidad en todos los campos, por preocuparte por mí en todo momento mostrándome con ello tu cercanía y tu lado más humano, por tu labor como directora y por todos tus buenos consejos.

A Juan Antonio, gracias por mostrar esa confianza en mí que en muchísimas ocasiones me han ayudado a continuar de forma optimista, por ese toque relajado que le aportas a la ciencia que la hacen divertida y por todo tu apoyo.

A Pepe García, gracias por estar siempre disponible a una charla científica y por tus bromas que nos hacen reír de vez en cuando.

A Diego, ya que por las casualidades de la vida me condujiste hasta este laboratorio y me animaste a encaminarme en este mundillo.

A Mariángeles, por toda tu ayuda, por todo el trabajo tedioso en el que me has ayudado en momentos duros y cuando me has visto más agobiada, y por supuesto, por tus dosis de chocolate y de ese que no engorda.

A Julia por estar siempre dispuesta a echar una mano ayudando en todo momento y por transmitir tu motivación y ganas de trabajar a todos.

A Inma S., por ayudarme en mis primeros pasos y siempre y cuando te he necesitado, por todos los ratos que hemos compartido juntas, que han sido muchos y por seguir animándome y apoyándome desde la lejanía.

A Rosario y Merche a las que he cogido un cariño especial, a las dos, por animarme en mis malos momentos, por vuestros consejos y vuestra ayuda y por los buenos ratos que hemos echado.

A Mariajo, Gloria y Estefanía porque juntas hemos recorrido este camino, apoyándonos en los momentos difíciles que nos da este campo, y también en los personales que hemos compartido.

A Maribel por todos los ánimos que me has ido dando durante todo este tiempo y por todos los momentos compartidos.

A Nuria, Soco y Narciso por vuestro interés por mi trabajo y vuestro apoyo.

Al Doctor Renato Capasso de la Università Federico II di Napoli, su equipo (Mena, Antonio y Marianna) y el genial grupo de becarios de la Facultad (Marianna, Giusy, Alessio, Antonio, Fabio, Stefania, Michelle, Gabriella), por haberme brindado la oportunidad de haber tenido mi primera experiencia fuera de España, por todas las ideas aportadas en este estudio y por haberme introducido en el mundo de la química, y sobre todo por enseñarme a sobrevivir cuando uno no tiene los medios apropiados. Gracias por que ha sido una de las experiencias personales más enriquecedoras de mi vida.

Al Doctor Antonio Malorni y la Profesora Virginia Carbone del Centro de Espectrometría de Masas, Proteómica y Biología Molecular del CNR de Avellino y todo su genial equipo (Livia, Rosa, Paola, Gabriella, Giusi, Angela, Analisa, Sonjia, Manuela, Giovanna, Fiorella, Marcelo) por vuestra buenísima acogida y en especial a Virginia y a Ángela, por haberse volcado tanto en mi trabajo, gracias por todo y por haberme hecho pasar tres meses tan amenos.

A la doctora Carmen LLuch del departamento de fisiología vegetal, como coordinadora del programa de doctorado y como tutora, por toda la ayuda prestada y tu continua disposición.

A toda la gente de la Estación Experimental del Zaidín que ha hecho posible la realización de mi tesis en especial a Javier Huertas por su magnífico soxhlet y por permitir que no nos asfixiáramos todos con el acetato de etilo cuándo no teníamos campana de extracción y a German por la ayuda prestada en los ensayos de campo.

A todos los becarios de la Estación y compañeros de doctorado con los que he compartido muy buenos momentos.

A los del “laboratorio de enfrente” Sensi, Antonio, Tita, Lola, Rafa, Gloria... porque sois unos vecinos geniales.

A toda la gente que ha pasado por el laboratorio y ya no están Cesar, Rosy, Martín, Rafa y Mohamed porque de todos he aprendido siempre algo.

A Trini, por hacernos reír todas las tardes un rato con sus historias y su buen humor.

A la empresa oleícola Sierra Sur por la aportación de las muestras necesarias para la realización de esta tesis y su disponibilidad en todo momento.

A Maria, por llevar tantos años a mi lado, escuchándome y haciendo por entender este difícil mundo de la investigación tan ajeno y cercano a ella y por todas las risas que nos hemos echado juntas.

A mis amigos Cristina, Susana, Jorge, Toñi, Mariu, Adrián, Norberto, Lolo, Jaime, por estar siempre ahí en los momentos buenos y malos y además a Nacho por esos paseíllos campestres para estirar las piernas de vez en cuando.

A Sira y Mónica, por ser mis compañeras de batalla desde los orígenes además de grandes amigas.

A Chio y Lula, mis malagueñas más queridas, con las que he desconectado durante todos estos años en mis vacaciones y mis tiempos de ocio durante esta tesis, por todos los momentos que hemos compartido y por estar ahí siempre a pesar de los contratiempos. A Lula porque eres una pedazo de diseñadora, gracias por tu ayuda con la portada.

A Pachá, por ser tan especial... por apoyar mis decisiones y animarme en todo momento, por toda tú ayuda informática en esta tesis y por millones de cosas más...

A mis hermanas Maria y Bea, por escucharme y escucharme toda la vida ayudándome en mis continuas indecisiones, gracias por estar siempre ahí para todo. Gracias Maria, por tus consejos, por todo lo que compartimos y por conocerme mejor que nadie.

A mis padres, Jose Luis y Chelo, por ser las personas más importantes de mi vida, por haberme apoyado en todo lo que ha ido aconteciendo en ella, confiando en mí y ofreciéndome todo lo que habéis tenido y más. Gracias por estar siempre a mi lado.

Al resto de la familia, tíos y primos porque no hay nada más gratificante que sentir vuestro apoyo y cariño.

Y a todas las personas cercanas y que no he nombrado y que en parte o de algún modo me han ayudado, gracias por que todos habéis aportado vuestro granito de arena para aprender algo de todos y cada uno sirviéndome para formarme día a día en la parte más difícil, a formarme como persona.

Índice



INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	3
INTRODUCCIÓN	7
1. Agricultura sostenible	7
1.1. Biofertilizantes	8
<i>Hongos formadores de micorrizas</i>	<i>8</i>
1.2. Fertilizantes a partir de residuos	11
1.2.1. Problemática de los residuos	11
1.2.2. La Biorremediación como tecnología del futuro	12
2. La agroindustria del olivar	13
2.1. La olivicultura	13
2.2. Sistemas de extracción del aceite de oliva	14
3. Valorización de subproductos del olivar	16
3.1. Alpechín	16
3.2. Alpeorujó	18
3.2.1. Características y composición química del alpeorujó	18
3.2.2. Compuestos fenólicos del alpeorujó e importancia de su estudio	22
3.2.3. Usos y aprovechamientos del alpeorujó	25
1. <i>Aceite de alpeorujó</i>	<i>25</i>
2. <i>Energía</i>	<i>26</i>
3. <i>Abono agrícola</i>	<i>26</i>
4. <i>Productos de alto valor añadido</i>	<i>27</i>
5. <i>Otras formas de valorización</i>	<i>27</i>
4. Hongos transformadores de alpeorujó	28
4.1. Hongos saprobios del suelo	29
4.2. Hongos saprobios de la madera	30
<i>Hongos de la podredumbre blanda</i>	<i>30</i>
<i>Hongos de la podredumbre parda</i>	<i>31</i>
<i>Hongos de la podredumbre blanca</i>	<i>31</i>
5. Residuos lignocelulósicos	32
Celulosa	33
Pectina	33
Hemicelulosa	33
Lignina	34

Índice

6. Enzimas implicadas en procesos de degradación de materiales lignocelulósicos	34
Celulasas	35
Pectinasas	35
Hemicelulasa	35
Enzimas degradadoras de la lignina	36
<i>Fenoloxidasas</i>	37
<i>Peroxidasas</i>	38
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Alpeorujos seco y extractado	43
1.1. Características del alpeorujos	43
1.2. Extracciones físicas del alpeorujos	43
1.2.1. Extracciones sólido-líquido con extractor rotativo orbital	43
1.2.2. Extracciones sólido-líquido con Soxhlet	44
1.2.3. Extracción líquido-líquido de acetato de etilo a partir de extracto acuoso... ..	45
2. Hongos saprobios	46
2.1. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados	46
2.2. Aislamiento de hongos saprobios del suelo	47
2.3. Aislamiento de hongos saprobios de la madera	47
3. Hongos arbusculares	47
4. Medios de cultivo	48
4.1. Medio de cultivo para hongos saprobios	48
5. Incubación del alpeorujos y sus extractos sólidos y líquidos con hongos saprobios	49
5.1. Incubación del alpeorujos y sus extractos sólidos con hongos saprobios	49
5.2. Incubación de los extractos líquidos de alpeorujos con hongos saprobios	49
6. Ensayos con plantas	50
6.1. Suelo empleado	50
6.2. Plantas	51
6.3. Esterilización de semillas	51
6.4. Cultivos hidropónicos	52
6.5. Cultivos en maceta	52
6.6. Ensayos de campo	53
6.7. Determinaciones realizadas en ensayos con plantas	53

7. Cuantificación de la micorrización en raíces	54
7.1. Tinción de raíces.....	54
7.2. Cuantificación de la micorrización.....	54
8. Ensayos de fitotoxicidad en <i>Lepidium sativum</i>	55
9. Ensayos de decoloración de alpeorujos	56
10. Técnicas bioquímicas y determinaciones enzimáticas.....	56
10.1. Obtención de los extractos enzimáticos de alpeorujos.....	56
10.2. Sustratos utilizados	57
<i>Obtención de xiloglucano</i>	57
10.3. Determinación cuantitativa de las actividades enzimáticas.....	58
10.3.1. Determinación de la actividad endohidrolítica	58
10.3.2. Determinación de la actividad lacasa	59
10.3.3. Determinación de la actividad manganeso peroxidasa.....	60
10.4. Determinaciones analíticas	60
10.4.1. Determinación de azúcares totales	60
10.4.2. Determinación de polifenoles totales extractables	61
11. Cromatografía en capa fina (TLC)	62
12. Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa acoplada a la detección por espectrometría de masas	62
13. Análisis estadístico de los resultados.....	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
I. Fraccionamiento físico del alpeorujos y determinación de su fitotoxicidad	67
1.1. Fitotoxicidad del alpeorujos.....	67
Objetivo	67
1.1.1. Análisis de la fitotoxicidad del alpeorujos sobre plantas cultivadas en macetas	67
Materiales y métodos.....	67
Resultados.....	68
1.1.2. Análisis de fitotoxicidad del alpeorujos sobre plantas cultivadas en parcelas de campo.....	68
Materiales y métodos.....	68
Resultados.....	69

Índice

1.2. Fitotoxicidad de las fracciones físicas del alpeorujó	70
1.2.1. Fitotoxicidad del alpeorujó extractado mediante extracción orbital	70
Objetivo	70
Materiales y métodos	70
Resultados	72
1.2.2. Fitotoxicidad del alpeorujó extractado mediante extracción con soxhlet.....	73
Objetivo	73
Materiales y métodos	73
Resultados	75
Discusión.....	77
II. Uso de los hongos saprobios para la eliminación de la fitotoxicidad del	
alpeorujó.....	83
2.1. Efecto de los metabolitos secundarios producidos por hongos saprobios en el	
crecimiento de plantas	83
Objetivo	83
Materiales y métodos	83
Resultados	84
2.2. Condiciones experimentales para el estudio de reducción de fitotoxicidad del	
alpeorujó por hongos saprobios	86
2.2.1. Selección de hongos que disminuyen la fitotoxicidad del alpeorujó.....	86
Objetivo	86
Materiales y métodos	86
Resultados	87
2.2.2. Efecto de distintos medios de crecimiento de hongos saprobios en la	
reducción de fitotoxicidad del alpeorujó	89
<i>Crecimiento de los hongos saprobios en extractos de alpeorujó</i>	<i>89</i>
Objetivo	89
Materiales y métodos	89
Resultados	89
<i>Crecimiento de los hongos saprobios en distintos medios de cultivo</i>	<i>91</i>
Objetivo	91
Materiales y métodos	91
Resultados	91

2.2.2.1. Efecto de la aplicación de sales	91
2.2.2.2. Efecto de la aplicación de fuente de carbono	92
2.2.3. Efecto del tiempo de incubación de los hongos saprobios en la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujos	94
Objetivo	94
Materiales y métodos.....	94
Resultados.....	95
Ensayo de fitotoxicidad	95
Biomasa fúngica	97
Contenido fenólico	97
Actividad lacasa.....	99
Discusión.....	99
III. Mecanismos de disminución/eliminación de la fitotoxicidad de las fracciones físicas del alpeorujos por los hongos saprobios	107
Objetivo	107
3.1. Extracción orbital	107
Materiales y métodos.....	107
Resultados.....	109
3.1.1. Extractos de alpeorujos obtenidos mediante extracción orbital.....	109
Fitotoxicidad de los extractos de alpeorujos	110
Biomasa fúngica	112
Contenido fenólico	112
Contenido en azúcares totales.....	118
Actividades endohidrolíticas	119
Actividades ligninolíticas	121
3.1.2. Alpeorujos extractados mediante extractor rotativo orbital.....	123
Fitotoxicidad de los alpeorujos extractados	123
Contenido fenólico	125
Contenido en azúcares totales.....	126
Actividades endohidrolíticas	127
Actividades ligninolíticas	129
3.2. Extracción mediante soxhlet.....	130
Materiales y métodos.....	130

Índice

Resultados.....	132
3.2.1. Extractos de alpeorujos obtenidos mediante soxhlet	132
Fitotoxicidad de los extractos de alpeorujos	132
Biomasa fúngica	135
Contenido fenólico	136
Contenido en azúcares totales.....	146
Actividades hidrolíticas	147
Actividades ligninolíticas	150
3.2.2. Alpeorujos extractados mediante soxhlet	152
Fitotoxicidad de los alpeorujos extractados mediante soxhlet	152
Contenido fenólico	153
Contenido en azúcares	155
Actividades hidrolíticas	156
Actividades ligninolíticas	158
Decoloración del alpeorujos.....	159
Objetivo	159
Materiales y métodos.....	160
Resultados.....	160
Discusión.....	161
IV. Efecto del alpeorujos transformado por hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas arbusculares	183
Objetivo	183
4.1. Efecto de fracciones físicas del alpeorujos sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas arbusculares	183
Materiales y métodos.....	183
Resultados.....	184
4.2. Efecto del extracto acuoso de alpeorujos, transformado por hongos saprobios, sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas.....	188
Materiales y métodos.....	188
Resultados.....	188
4.3. Efecto del alpeorujos extractado con agua, transformado por hongos saprobios, sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas.....	193
Materiales y métodos.....	193

Resultados.....	193
Discusión.....	195
V. Efecto del alpeorujó y sus fracciones físicas tratadas con hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas bajo condiciones de campo.....	203
Objetivo	203
5.1. Efecto del alpeorujó extractado con acetato de etilo y transformado por <i>C. rigida</i> en ensayos de invernadero	203
Materiales y métodos.....	203
Resultados.....	204
5.2. Efecto del alpeorujó extractado con acetato de etilo y transformado por <i>C. rigida</i> en ensayos de campo	206
Materiales y métodos.....	206
Resultados.....	207
Discusión.....	209
DISCUSIÓN GENERAL	215
CONCLUSIONES	231
BIBLIOGRAFÍA.....	235

Interés y objetivos del trabajo



INTERÉS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La creciente demanda de aceite de oliva, dadas las propiedades beneficiosas que posee para la salud y su presencia en la dieta Mediterránea, hacen que la agroindustria del olivar sea de enorme importancia en España y especialmente en Andalucía donde se produce el 80% del aceite de oliva de España. Las transformaciones tecnológicas producidas en el proceso de elaboración del aceite de oliva a lo largo de los últimos veinticinco años han ido modificando notoriamente la producción, composición y aprovechamiento de sus subproductos. El sistema de extracción continua mediante centrífugas de tres fases que genera aceite, “orujo” y “alpechín” se ha ido sustituyendo progresivamente desde los años noventa y en la actualidad, en casi la totalidad de las almazaras del país, se ha implantado el sistema continuo de dos fases donde, además de aceite, se produce un residuo denominado “alpeorujo”. El objetivo de este cambio tecnológico en el proceso de extracción fue la reducción del consumo de agua y de energía aunque esta modificación sin embargo genera un residuo cuyo manejo supuso nuevas adaptaciones del sector respecto a su transporte y almacenamiento y lo que fue más importante respecto a su uso y valorización.

Actualmente el alpeorujo se destina, tras secarlo y extraerle el aceite de orujo, a la cogeneración de energía eléctrica y térmica mediante combustión, sin embargo, y debido a la gran cantidad de residuo que se generan en cada una de las campañas oleícolas, es necesaria la búsqueda de vías alternativas para el tratamiento de estos subproductos.

El alpeorujo, dada su composición vegetal y su riqueza en materia orgánica así como de otros componentes de interés agroquímico, podría emplearse como un enmendante orgánico. Este uso del alpeorujo como fertilizante contribuiría a restablecer los niveles de materia orgánica de los suelos que se pierde continuamente por mineralización y provocan cambios en la estructura del suelo. Sin embargo el alpeorujo posee componentes tóxicos de naturaleza muy variada que producen efectos nocivos sobre el suelo y los cultivos vegetales por lo que se necesita su estabilización antes de su uso. Para dar respuestas al problema que genera la existencia de una gran cantidad de alpeorujo y la falta de fuentes de materia orgánica, surgen iniciativas dentro del sector de la agricultura ecológica donde se opta por la estabilización y biotransformación de este subproducto con objeto de obtener fertilizantes orgánicos.

Se han realizado algunos estudios de utilización de tratamientos biológicos para la estabilización del alpeorujó, sin embargo, y debido a la composición compleja de este residuo, estos tratamientos requieren largos periodos de tiempo y no son demasiado efectivos. El fraccionamiento físico del alpeorujó permitiría la separación de sus componentes que facilitaría la acción detoxificadora de los microorganismos. Por ello, el objetivo de la presente Memoria Doctoral es plantear un aprovechamiento integrado del alpeorujó mediante la combinación de un fraccionamiento físico y tratamiento biológico. Esta nueva forma de abordaje para la valorización del alpeorujó nos permitiría obtener antioxidantes que pueden ser utilizados con fines industriales y un enmendante orgánico que aporte a las plantas grandes beneficios nutricionales. Este objetivo general se abordará en la presente Memoria Doctoral con los siguientes objetivos específicos:

- I. Fraccionamiento físico del alpeorujó y determinación de su fitotoxicidad.
- II. Uso de los hongos saprobios para la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó.
- III. Mecanismos de disminución/eliminación de la fitotoxicidad de las fracciones físicas del alpeorujó por los hongos saprobios.
- IV. Efecto del alpeorujó transformado por hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas arbusculares.
- V. Efecto del alpeorujó y sus fracciones físicas tratadas con hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas bajo condiciones de campo.

Introducción



INTRODUCCIÓN

1. Agricultura sostenible

En los años 60 y 70 surge la denominada “Revolución verde” en la que la mejora de plantas cultivadas y prácticas agrícolas basadas en la agroquímica y en la mecanización logró un gran aumento en la producción agrícola en zonas del mundo como Latinoamérica y Asia. Con las mejoras obtenidas en el ámbito productivo pronto se extendió esta corriente a la mayor parte del mundo implantándose un nuevo modelo llamado “agricultura intensiva”. La agricultura intensiva, basada en el uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas, trajo consigo múltiples efectos negativos para el medio ambiente. Entre ellos cabe destacar la contaminación de acuíferos, suelo y aire, la disminución de la diversidad ecológica y la pérdida de fertilidad del suelo como consecuencia de una mineralización rápida de la materia orgánica que afecta directamente a la estructura del suelo y consecuentemente provoca problemas de erosión y desertificación. A ello además hay que añadir los altos costes energéticos que supone la fabricación de fertilizantes nitrogenados ya que la mayoría de la energía que se consume proviene de combustibles fósiles no renovables.

Tras los inconvenientes surgidos en la revolución verde, con el empleo excesivo de agroquímicos y plaguicidas, el encarecimiento de los abonos y la sobreexplotación del suelo surge la necesidad de una agricultura de conservación para mantener los rendimientos alcanzados con la revolución verde pero evitando el deterioro ambiental que se producía. Es cuando surge la Agricultura sostenible definida como un sistema integrado de prácticas de producción de plantas y animales, en los que se pretende aumentar la cantidad y/o calidad de la producción además de conservar los recursos naturales de los sistemas agrícolas y disminuir los impactos negativos de la agricultura sobre el medio ambiente. Las prácticas dirigidas a una agricultura sostenible contemplan el uso del potencial biológico y genético de las especies animales y vegetales con el fin de incrementar la productividad, potencian tanto los procesos naturales en las prácticas agrícolas como las relaciones entre distintos organismos (beneficiosas o de patogénesis) o el ciclado biogeoquímico de los nutrientes y reducen el uso de los fertilizantes químicos y fitosanitarios.

Para alcanzar uno de los principales objetivos de la agricultura sostenible de reducir el uso de fertilizantes químicos, está cobrando especial interés el empleo de estrategias alternativas como son el uso tanto de biofertilizantes como de fertilizantes a base de residuos. Se está impulsando el uso de residuos y desechos del sistema de producción alimentaria para reciclar los nutrientes minerales, esto combinado con avances tecnológicos como la biotecnología y biorremediación produce una integración de los subproductos generados en este sector. En este contexto los biofertilizantes son también una forma de potenciar el crecimiento vegetal con el empleo de microorganismos del suelo o rizosféricos. Los microorganismos del suelo intervienen en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, solubilizando elementos minerales, fijando el nitrógeno atmosférico y mineralizando los nutrientes integrados en los compuestos orgánicos, lo que conlleva un aumento en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

1.1. Biofertilizantes

Los biofertilizantes o abonos biológicos están basados en el empleo de microorganismos que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Estos microorganismos facilitan de manera directa o indirecta la disponibilidad de determinados nutrientes aunque también los hay que producen sustancias (fitohormonas) promotoras del crecimiento vegetal. Además, algunos de estos microorganismos pueden combinarse produciendo efectos sinérgicos cuando se aplican de manera conjunta. Entre los microorganismos del suelo beneficiosos para las plantas se encuentran los microorganismos saprobios que desempeñan un papel fundamental en la degradación de la materia orgánica y ciclado de nutrientes, así como los microorganismos simbioses mutualistas que son aquellos que establecen una relación con otro organismo y en la que las dos poblaciones resultan beneficiadas de este tipo de interacción. La simbiosis mutualista más importante por su aplicabilidad como biofertilizantes son las micorrizas.

Hongos formadores de micorrizas

El término micorriza hace referencia a determinadas asociaciones existentes entre ciertos hongos del suelo y raíces de plantas. Se estima que más del 97% de las plantas

terrestres se encuentran formando parte de esta simbiosis (Harley y Smith, 1983). Las asociaciones micorrícicas son muy variadas en estructura y función pero las más extendidas en la naturaleza son las micorrizas arbusculares. Las micorrizas arbusculares son asociaciones de hongos del phylum *Glomeromycota* con plantas superiores (Schüßler *et al.*, 2001).

En el proceso de formación de la micorriza ocurren una serie de interacciones hongo-planta que van a dar en último extremo a una integración morfológica y funcional de ambos simbioses (Gianinazzi-Pearson, 1996). El hongo arbuscular se encuentra en forma de espora en el suelo y en condiciones favorables ésta germina y forma micelio que se extiende a través del suelo. Una vez que la hifa alcanza la superficie de la raíz de una planta hospedadora susceptible de ser micorrizada se diferencia formando los apresorios, estructura formada tras una ramificación de la hifa y engrosamiento de su pared celular. Después la hifa penetra en la raíz de la planta y se produce un crecimiento intercelular e intracelular de la misma hasta llegar a las zonas del parénquima cortical donde se forman las estructuras más características de la simbiosis, los arbusculos. Los arbusculos son ramificaciones dicotómicas repetidas de las hifas intracelulares donde se produce el transporte de nutrientes (Smith *et al.*, 1994).

La micorriza es una simbiosis bidireccional con un papel fundamental en la mejora de la nutrición de plantas principalmente a través de un aumento en la captación de fósforo a cambio de recibir carbono de los fotosintetizados de las plantas hospedadoras (Jakobsen, 1995). Sin embargo, también se ha descrito que las micorrizas juegan un papel destacado en aspectos no nutritivos de las plantas. Las micorrizas confieren a las plantas resistencia/tolerancia frente a múltiples estreses tanto bióticos como abióticos. Se ha estudiado la resistencia y tolerancia que confieren las micorrizas frente a patógenos ya que compiten por los sitios de colonización o infección con las poblaciones microbianas de la rizosfera (Linderman *et al.*, 1983) y/o porque activan mecanismos de defensa de las plantas (Cordier *et al.*, 1996). La tolerancia frente a estreses abióticos como sequía o salinidad se debe a la combinación de efectos físicos, nutricionales, fisiológicos y celulares (Ruiz-Lozano, 2003). Se ha sugerido que las micorrizas en estos casos mejoran la transferencia hídrica, el ajuste osmótico y las propiedades físicas del suelo aumentando la retención hídrica, el intercambio gaseoso de la planta hospedadora y los cambios nutricionales (Porcel y Ruiz-Lozano, 2004). Además estas producen la estimulación de actividades asimilativas esenciales para las plantas y disminuyen el daño oxidativo a biomoléculas protegiéndolas frente al

fenómeno de senescencia nodular prematura inducida por sequía (Porcel, 2006). Las micorrizas protegen además a las plantas incrementando la resistencia frente a estados de deficiencia de nutrientes y suelos degradados por procesos erosivos y por exceso de laboreo, tras incendios forestales o en zonas mineras. Por otro lado también aportan resistencia frente a la presencia de metales pesados. Se ha descrito que las plantas micorrizadas aumentan la tolerancia a metales como Zn y Cd (Ricken y Hofner, 1996; Porcel y Ruiz-Lozano, 2004; Arriagada *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2006). El aumento de esta tolerancia de la planta a metales pesados no está claro aunque parece ser debido a la unión de dichos metales a la hifa que provoca por tanto una disminución de la translocación del metal desde la raíz a la parte aérea o bien a la formación de complejos y precipitados con los mismos (Barea *et al.*, 1993). Por otra parte se ha descrito que las micorrizas son útiles en fitorremediación ya que se ha observado que estas aumentan la captación de ciertos metales del suelo por parte de la planta de manera que se conseguiría la eliminación de dichos metales y su incorporación a los tejidos vegetales y estructuras fúngicas (Dehn y Schüepp, 1990; Rosen *et al.*, 2005). Las micorrizas también mejoran la estructura del suelo por medio de la formación de agregados estables, actuando el micelio junto con la raíz como nexo de unión entre las partículas orgánicas e inorgánicas (Tisdall *et al.*, 1997). Además mejoran el enraizamiento y aumentan la superficie de intercambio hídrico en la planta penetrando en poros del suelo que resultan inaccesibles para las raíces (Allen, 1982). Se ha descrito que la simbiosis micorrízica favorece la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal.

Las micorrizas confieren resistencia a las plantas frente a pesticidas (Ocampo y Hayman, 1980), herbicidas (García-Romera y Ocampo, 1988) y diferentes residuos como son los residuos procedentes de la industria petrolífera (Cabello, 1997). Se ha propuesto el uso de micorrizas en biorremediación ya que se ha observado que en sustratos contaminados con hidrocarburos aromáticos la presencia de las micorrizas provoca una disminución de dichos contaminantes en el suelo (Volante *et al.*, 2005). Se ha observado que la aplicación de otros residuos como orujos o restos de caña de azúcar, tratados con hongos saprobios solubilizadores de fósforo junto con hongos micorrícicos, favorecieron el crecimiento y estado nutricional de la planta ensayada (Caravaca *et al.*, 2004a; Caravaca *et al.*, 2004b). Por otro lado, se ha descrito que la aplicación de residuos agroindustriales como alpeorajo a plantas previamente micorrizadas aumentó la biomasa de plantas de lechuga y soja respecto a las plantas no

micorrizadas aunque cuando la aplicación del alpeorajo y la inoculación de los hongos arbusculares se realizó al mismo tiempo, aumentó la sensibilidad de estas al residuo (Martín *et al.*, 2002).

Podemos concluir por tanto que las micorrizas además de mostrar un papel importante como biofertilizantes tienen un papel fundamental en aliviar distintos estreses mediante un efecto indirecto de la mejora nutricional de la planta (especialmente de P y N) o por efectos directos del hongo aún escasamente estudiados.

1.2. Fertilizantes a partir de residuos

1.2.1. Problemática de los residuos

Un residuo se define como aquella sustancia u objeto que deja de tener valor en el contexto en el que se produce y del cual su poseedor se desprenda o del que tenga la intención u obligación de desprenderse. Consecuentemente el volumen de residuos que genera una sociedad se relaciona de forma directa con su nivel de desarrollo económico. En las últimas décadas, el desarrollo económico general junto con el incremento de población que se ha producido a escala mundial, ha provocado un aumento espectacular del volumen de residuos en todo el planeta.

El término contaminación puede usarse para describir todos aquellos efectos de la actividad humana que causan un efecto negativo en el medio ambiente, siendo la producción de residuos la principal causa de contaminación. En los distintos sectores de actividades de nuestra sociedad, el sector primario representa el 80% del total de los residuos generados. En este sector se incluyen los residuos agrícolas, ganaderos, forestales y aquellos derivados de técnicas extractivas (canteras y minas). Los residuos forestales se emplean como combustible y como materia prima dentro de la industria papelera. Los residuos ganaderos, entre los que se incluyen residuos ganaderos de cría (excrementos, camas y lechos) y residuos de matadero (huesos, sangre y pellejo) y los residuos agrícolas que comprenden los residuos de poda y de cosecha, generalmente se incineran o se someten a compostaje por diferentes técnicas. En un contexto más amplio pueden considerarse también como residuos agrícolas los subproductos de origen vegetal generados por las industrias de transformación agrícolas y algunos residuos agrícolas específicos. Entre estas industrias destacan la industria arrocera,

oleícola, vitivinícola, del café, harineras, cerveceras, textil, de frutos secos y de transformación de hortalizas. La industria oleícola es especialmente importante en España y la producción de residuos derivados de la agroindustria del olivar representa un gran problema en la actualidad.

La intensificación y globalización de la producción agrícola determina una disminución de los recursos naturales y un aumento de los desechos generados. Se hace por tanto necesario una gestión de estos residuos cuyo objetivo primordial debe ser la conversión de los residuos orgánicos en recursos, para lo cual es necesario aplicarle un tratamiento acorde con el destino final.

1.2.2. La Biorremediación como tecnología del futuro

La biorremediación es el uso de organismos vivos (bacterias, hongos, animales y plantas) para degradar sustancias contaminantes. Las biotransformaciones de compuestos orgánicos e inorgánicos por la actividad metabólica de organismos son procesos bioquímicos naturales que ocurren en el medio ambiente, aunque el hombre puede interferir potenciando estos procesos o introduciendo organismos más eficientes para tal fin. La biorremediación puede realizarse *in situ*, cuando se realiza en su localización original o bien *ex situ* cuando el sedimento contaminado es transportado a otra localización para su posterior tratamiento.

La biorremediación puede llevarse cabo mediante:

Degradación enzimática: Consiste en el empleo de enzimas en un sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas. Dichas enzimas son previamente producidas por microorganismos transformados genéticamente o no. Esta aplicación de la biotecnología lleva décadas funcionando y hoy en día las compañías biotecnológicas ofrecen las enzimas y los microorganismos genéticamente modificados para tal fin. Este tipo de técnicas se emplea en la degradación de contaminantes como tintes industriales, efluentes como alpechines y distintos compuestos xenobióticos.

Remediación microbiana: Se refiere al uso de microorganismos directamente en el foco de la contaminación o en el residuo. Estos microorganismos pueden ya existir en ese sitio o pueden provenir de otros ecosistemas, en cuyo caso deben ser inoculados en el sitio contaminado o en el residuo si se trata de una biorremediación *ex situ*. Cuando no es necesaria la inoculación de microorganismos, suelen administrarse

nutrientes sobre el residuo o lugar de la contaminación con el fin de acelerar el proceso. Este tipo de biorremediación se emplea en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos, metales pesados y en residuos sólidos urbanos y agrícolas (alpeorujos y alpechín), etc.

Fitorremediación: Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos.

Biorremediación animal: Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad o poseer en su interior microorganismos capaces de retener determinados compuestos como metales pesados. Las lombrices son un ejemplo y una importante herramienta en este campo ya que son capaces de crecer en lodos de aguas residuales, orujos y alpeorujos.

La biorremediación se viene empleando en el tratamiento de todo tipo de residuos con el fin de reducir la demanda biológica y química de dichos residuos y de este modo poderlos utilizar o desechar sin ningún peligro medioambiental. En el caso de residuos orgánicos con potencial fertilizante como los residuos agrícolas, la biorremediación permite eliminar los componentes tóxicos de estos y formar un producto estabilizado con posibilidad de uso como abonos.

2. La agroindustria del olivar

2.1. La olivicultura

El cultivo del olivo es una antigua tradición centenaria especialmente importante por la obtención del aceite de oliva. La producción de aceite de oliva está concentrada en los países de la cuenca mediterránea: España, Portugal, Italia, Grecia, Turquía, Siria, Túnez y Marruecos y representa el 89% de la producción mundial (Fig. 1). Sin embargo, recientemente países como Argentina, Australia y África del sur están iniciándose en el cultivo intensivo de olivos.

España es uno de los principales países productores de aceite de oliva de la Comunidad Europea con una producción media de 700.000 a 800.000 toneladas al año (Datos obtenidos del Internacional Olive Oil Council). En la campaña 2005-2006 el balance de la producción de aceite de oliva fue 824.600 toneladas (datos de la Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación). La

superficie de olivar en España se encuentra distribuida en su mayoría en Andalucía y Castilla la Mancha y el resto se reparte entre Extremadura y Cataluña principalmente y en menor medida en la Comunidad Valenciana, Aragón y Murcia. La producción en Andalucía representa un 80% de la producción española y más del 40% de la europea.

La agroindustria del olivar que gira en torno a la obtención del “denominado oro líquido” produce multitud de problemas medioambientales debido a los residuos y subproductos generados que resultan perniciosos para el medio ambiente.

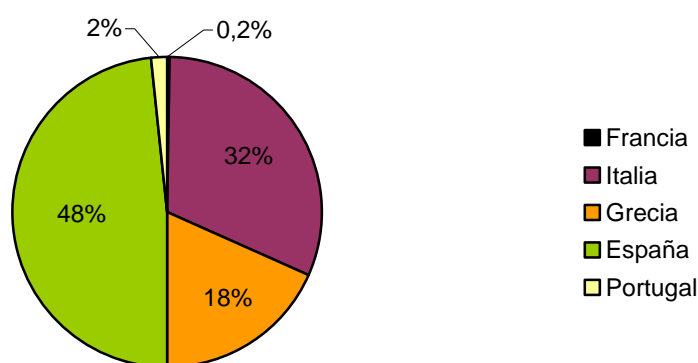


Fig. 1. Porcentaje de producción de aceite de oliva en los países pertenecientes a la Comunidad Económica Europea (Datos Internacional Olive Council 2006).

2.2. Sistemas de extracción del aceite de oliva

El proceso de extracción del aceite de oliva comprende diferentes etapas. En principio tiene lugar la recepción y selección de las aceitunas en la almazara donde se toman muestras para determinar la calidad y el rendimiento de las mismas. Las aceitunas luego pasan por un sistema de ventiladores donde se lleva a cabo la limpieza de hojas y piedras que contengan. Posteriormente se procede al lavado de las mismas para eliminar restos de contaminantes agrícolas como insecticidas o fertilizantes, así como polvo y otras suciedades. Una vez limpias, estas aceitunas se muelen mediante trituradores para permitir la salida del aceite y la pasta de aceituna obtenida se bate para finalmente extraer el aceite. La cantidad y propiedades físico-químicas de los residuos generados en la producción de aceite de oliva dependerán del método usado para la extracción (Fig. 2).

Los sistemas de extracción de aceite de oliva han ido cambiando progresivamente debido a los avances tecnológicos en el sector, así, a principios de los años 70 el sistema de prensado clásico por presión se sustituyó por un **sistema de centrifugas en tres fases**. En este sistema se introduce la masa de aceituna en el decánter o decantador centrífugo horizontal junto con agua del exterior para fluidificar la pasta y hacerla girar a gran velocidad. Con esta centrifugación se consigue la separación por diferencia de densidad de una fase líquida oleosa o aceite, otra líquida acuosa o alpechín resultante del agua añadida para fluidificar la pasta de aceituna antes de introducirla en la centrífuga, la del lavado de aceituna, y la propia que contiene el fruto y una fase sólida u orujo compuesta por la pulpa, hueso y piel de la aceituna. Este sistema requiere la aplicación suplementaria de agua y provoca la aparición de alpechines con un gran poder contaminante.

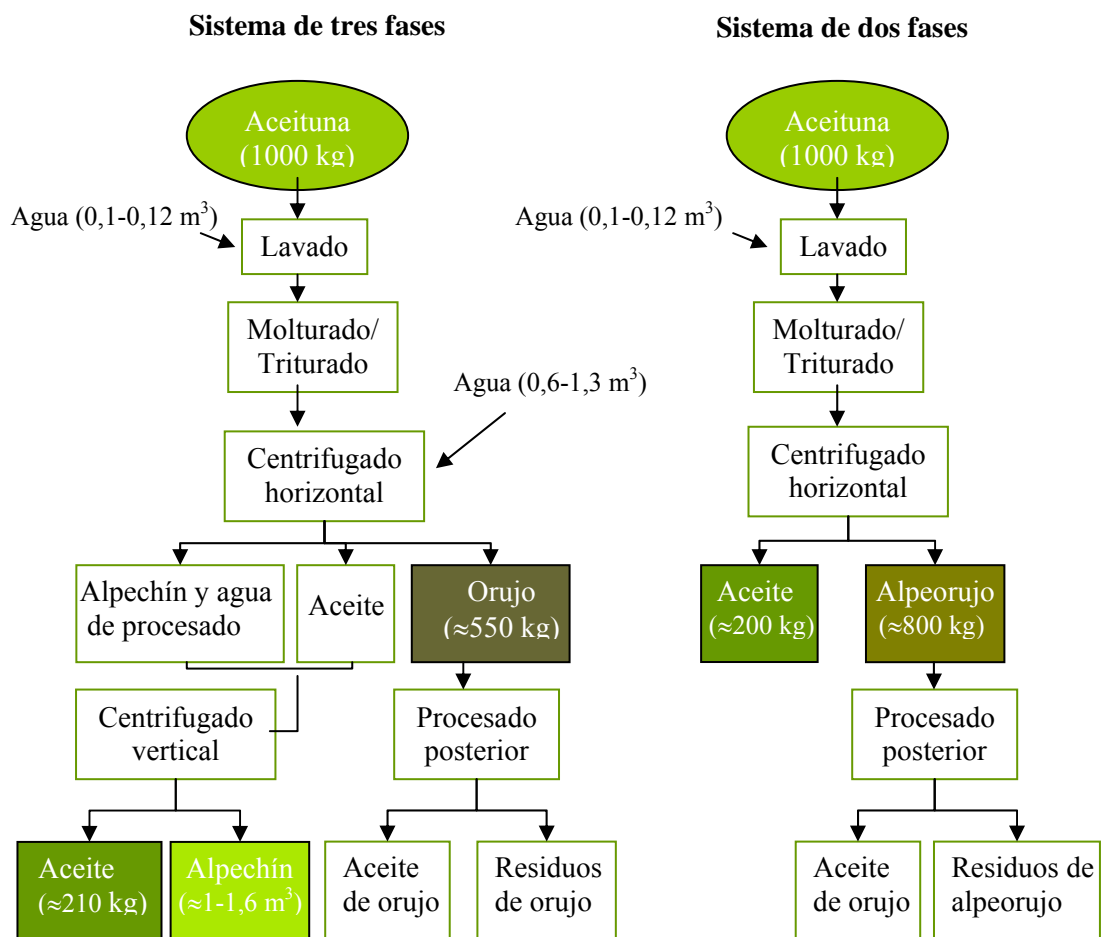


Fig. 2. Extracción del aceite de oliva mediante sistema de extracción continua de tres y dos fases (Alburquerque *et al*, 2004).

A principios de los 90 se introdujo un nuevo **sistema de extracción** de aceite de oliva mediante **centrífugas de dos fases** que redujo en un 75% la proporción de residuos. Con este sistema de extracción no es preciso aplicar agua del exterior a la pasta de aceituna, por lo tanto el volumen generado de fase acuosa o alpechín es casi nulo. Tras la centrifugación con el sistema conocido como “sistema ecológico” se obtiene la fase oleosa y un residuo sólido con algo de aceite y con bastante más humedad que el que se obtiene en el sistema continuo de tres fases y conocido como **alpeorujó húmedo o alperujó húmedo**.

Una de las principales ventajas de este sistema de extracción de aceite de oliva con respecto al de tres fases, como se ha mencionado anteriormente, es la reducción de la cantidad de agua empleada con la consecuente disminución de los alpechines obtenidos. Por otra parte, la calidad del aceite de oliva es mayor ya que con el sistema de extracción de dos fases el contenido de fenoles que permanece en el aceite de oliva aumenta un 1% con respecto al de tres fases (Alba *et al.*, 1992; Vierhuis *et al.*, 2001). Sin embargo este sistema genera un nuevo subproducto que muestra también problemas al tratarse de un residuo de consistencia sólida y con alta humedad, por lo que se requieren nuevos lugares de almacenaje, camiones para transportarlos y toda una serie de adaptaciones a este nuevo residuo.

No obstante y a pesar de la desventaja en el uso y manejo del alpeorujó, hoy día en España la mayoría de las almazaras emplean el sistema continuo de dos fases produciendo cantidades enormes de dicho residuo, ya que se obtienen 80 toneladas de alpeorujó de cada 100 toneladas de aceitunas extraídas. La producción de alpeorujos es especialmente importante en Andalucía, comunidad que cuenta con el mayor número de extractoras de España, pues se han obtenido en las últimas campañas entre 3.500.000 y 4.000.000 toneladas/año (Datos campaña 2006 suministrados por la Agencia para el Aceite de Oliva del Ministerio de agricultura, pesca y alimentación).

3. Valorización de subproductos del olivar

3.1. Alpechín

El alpechín, residuo líquido obtenido tras el proceso de extracción del aceite de oliva mediante el sistema de tres fases, está constituido por restos de pulpa, aceite,

mucílagos y pectinas suspendidos en una emulsión estable (Paredes *et al.*, 1999). Su composición química es muy variable dependiendo de la variedad de aceitunas, el proceso de extracción, el periodo de recogida del fruto, etc. El alpechín presenta un alto contenido en materia orgánica así como numerosos nutrientes como magnesio y potasio además de ácidos orgánicos, alcoholes, lípidos y polifenoles (Tabla 3). El poder contaminante del alpechín ha sido atribuido fundamentalmente al contenido fenólico y de ácidos grasos así como al efecto sinérgico de estos con otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Della Greca *et al.*, 2001). Estos atributos le confieren marcadas propiedades tanto antibacterianas (Moreno *et al.*, 2004) como fitotóxicas (Capasso *et al.*, 1992).

Se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a reutilizar, directa o previa transformación estos efluentes con fines agroganaderos o industriales (Roig *et al.*, 2006). Para ello es necesario eliminar la alta demanda química orgánica y el contenido fenólico del alpechín que pueden ocasionar problemas de contaminación ambiental. Entre los métodos físicos utilizados destacan la evaporación en balsas, criogénesis, coagulación con limos, separación con membranas (ósmosis inversa y ultrafiltración), floculación con polielectrolitos, concentración térmica y el empleo de biopolímeros que absorben fenoles y sales del alpechín (Borja *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2004; Sarika *et al.*, 2005). El inconveniente de este tipo de tratamientos es la obtención de fangos o lodos de alpechín los cuales posteriormente hay que volver a tratar por medio de compostaje u otras técnicas.

Además de estos tratamientos se ha estudiado el empleo de tecnologías avanzadas de oxidación, como herramienta para completar la mineralización de los componentes tóxicos del alpechín o para la eliminación selectiva de los contaminantes más biorresistentes y su conversión a intermediarios biodegradables. Entre estos procesos destacan la ozonación, la irradiación con UV, la fotocatalisis, el empleo del reactivo de Fenton, la oxidación electroquímica o la oxidación con aire húmedo (Benítez *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2001; Cermola *et al.*, 2004; Vlyssides *et al.*, 2005). Sin embargo estos tratamientos parecen ser más eficaces si se realizan como una pre-fase antes de un tratamiento biológico (Benítez *et al.*, 1999).

Dentro de los métodos biológicos utilizados para la valorización del alpechín destacan los tratamientos anaeróbicos y aeróbicos. La digestión biológica anaeróbica es menos efectiva que los tratamientos aeróbicos pero poseen algunas ventajas entre las que destacan un menor gasto energético y producción de fangos y la posibilidad de

aprovechar la producción de biogás (Marques, 2001; Dhouib *et al.*, 2006). El tratamiento biológico aeróbico es más eficaz que el anterior pero dadas sus características requieren diluciones del residuo antes de su tratamiento para paliar el efecto bactericida, tratamiento no compatible con los recursos hídricos de la cuenca Mediterránea. Aún así han sido numerosos los estudios aeróbicos realizados tanto con bacterias (Di Gioia *et al.*, 2001), levaduras (Lanciotti *et al.*, 2005) como con hongos (Hamdi *et al.*, 1991; Ben Hamman *et al.*, 1999; D'Annibale *et al.*, 2004) consiguiendo en la mayoría de los casos, aunque de forma más acusada cuando se emplearon hongos en el tratamiento, la eliminación de la carga fenólica y disminución de la fitotoxicidad.

Además de todas estas técnicas encaminadas a la detoxificación del alpechín para su uso como enmendante también se ha utilizado este residuo como fuente para la obtención de productos de alto valor añadido como hidroxitirosol (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002), xantano, polihidroxicarboxilatos (PHAs), exopolisacáridos, polihidroxiacrilatos y biosurfactantes (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1995; Paredes *et al.*, 2000) o como medio para la producción de biomasa (Sánchez *et al.*, 2004).

3.2. Alpeorujó

3.2.1. Características y composición química del alpeorujó

El alpeorujó es un producto natural obtenido de materiales crudos y por tanto sus características químicas varían en función de la campaña oleícola dependiendo de variables como las condiciones climatológicas de la cosecha, la variedad de olivo o el grado de maduración del fruto. Este residuo es una mezcla compleja constituida por piel, pulpa y huesos con un alto grado de humedad.

Entre las características agroquímicas del alpeorujó destacan una humedad alta (65%) en el caso del alpeorujó húmedo que disminuye drásticamente (15%) después del extractado y secado de dicho residuo (Tabla 1) (Cabrera *et al.*, 2002).

La presencia en el alpeorujó de sales minerales, un pH ligeramente ácido y un alto contenido en materia orgánica lo hace importante a la hora de considerarlo como abono mineral para las plantas. El alpeorujó es muy rico en K, al igual que el alpechín, sin embargo es pobre en N, P, Ca y Mg comparado con otros enmendantes orgánicos. En cuanto a la proporción de micronutrientes se ha descrito que el contenido de Mn es

variable, presenta gran proporción de Fe y cantidades considerables de Zn y Cu aunque en mucha menor proporción que de Fe. La mayoría de los constituyentes orgánicos que presenta dicho residuo son lignina, hemicelulosa y celulosa, por tanto es un residuo fundamentalmente lignocelulósico susceptible al compostaje (Tabla 2). Sin embargo el alpeorujo tiene partículas de pequeño tamaño y escaso material poroso lo que hace que sea un sustrato poco apropiado para compostar debido a la susceptibilidad de compactación (Alburquerque *et al.*, 2004).

Tabla 1. Caracterización de los distintos tipos de alpeorujo: alpeorujo húmedo (ALPH), alpeorujo seco no extractado (ALPSNE) y alpeorujo seco extractado (ALPSE) (Cabrera *et al.*, 2002).

	ALPH	ALPSNE	ALPSE
Humedad (%)	65,50	14,90	13,90
pH	5,62	6,06	5,88
N-Kjeldahl (%)	0,90	0,95	1,02
C/N	58,00	56,00	52,00
P₂O₅ (%)	0,34	0,33	0,41
K₂O (%)	1,94	2,37	2,93
Na (%)	0,07	0,06	0,06
Materia orgánica (%)	88,60	87,20	87,70
Lignina (%)	37,80	35,40	35,10
Grasas (%)	2,54	5,57	0,91
Carbono hidrosoluble (mg/kg)	93,70	47,80	56,10
Extractos húmicos totales (%)	15,20	14,40	12,70
Acidos húmicos (%)	3,91	5,07	2,20

Las grasas muy escasas en el alpeorujo seco y extractado pero presentes en los alpeorujos no extractados (húmedos o secos) y los carbohidratos hidrosolubles entre los que destacan el manitol y en menor cantidad sacarosa y fructosa constituyen una buena fuente como sustrato de crecimiento de microorganismos (Guillén *et al.*, 1992; Alburquerque *et al.*, 2004) (Tabla 1). Además, formando parte de la composición orgánica de este residuo, aparecen restos de pared celular de aceituna con una cantidad considerable de polisacáridos pécticos y polímeros de hemicelulosas ricos en xilano y xiloglucanos (Jiménez *et al.*, 2001).

El alpeorujo, tal y como lo muestran algunos estudios, no puede aplicarse directamente al suelo por los efectos fitotóxicos derivados principalmente de sustancias como los fenoles (Martín *et al.*, 2002, Sampedro *et al.*, 2004b). Además la elevada relación C/N dificulta su aplicación directa a los cultivos ya que provoca un hambre de N en los mismos que se debería corregir añadiendo una fuente adicional de nitrógeno

Introducción

como el estiércol (Cabrera *et al.*, 2002) (Tabla 2). Unido a todo lo anteriormente mencionado, la aplicación del alpeorujo al suelo determina efectos en las propiedades químicas y estructurales de este ya que produce una inmovilización del N disponible por las plantas, aumenta la salinidad en suelos de tipo anfibol por desplazamiento del Ca y el K al complejo de cambio y disminuye el Mg asequible a las plantas por efecto antagonico con el K (Paredes *et al.*, 1999). No obstante, estudios realizados con orujo de tres fases en condiciones de campo, han demostrado que la aplicación de este produce un aumento de la capacidad hídrica del suelo, del contenido en carbono orgánico total, de ácidos húmicos y fúlvicos, de K y de la relación C/N por disminución de N en suelo (Brunetti *et al.*, 2005).

Tabla 2. Caracterización agroquímica del alpeorujo seco y extractado utilizado durante esta Memoria Doctoral (Sampedro, 2005).

Caracterización agroquímica del alpeorujo	
pH	5,33
C/N	31,00
COT (g/kg)	585,00
CET (g/kg)	215,70
AH (g/kg)	29,60
AF (g/kg)	186,10
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
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.

Una comparativa agroquímica de los residuos obtenidos tras la extracción de aceite de oliva mediante el sistema de tres y dos fases ha puesto de manifiesto que el contenido fenólico del alpechín es ligeramente mayor que el del alpeorujo, manteniendo el mismo pH y una cantidad de materia orgánica de la mitad respecto al

alpeorujo. Según algunos autores en el alpeorujo aparecen una mayor tipología de fenoles que en el alpechín (Lesage-Meessen *et al.*, 2001). El alpeorujo en general presenta un mayor contenido en materia orgánica, N, P, K, Fe, Cu y una relación C/N ligeramente superior que el alpechín (Tabla 3).

Tabla 3. Características químicas del alpechín y alpeorujo según distintos autores: (a) Vlyssides *et al.*, 2004, (b) Cayuela *et al.*, 2004, (c) Albuquerque *et al.*, 2006a. MO= Materia orgánica.

ALPECHÍN	(a)	ALPEORUJO	(b)	(c)
pH	4,80	pH	5,23	5,20
EC (dS/m)	12,00	EC (dS/m)	5,24	4,12
MO (g/l)	57,40	MO (g/l)	94,30	94,80
C/N	52	C/N	49,30	57,90
N (g/l)	0,76	N (g/kg)	11,30	8,90
P (g/l)	0,53	P (g/kg)	0,90	1,10
K (g/l)	2,37	K (g/kg)	24,30	25,30
Na (g/l)	0,30	Na (g/kg)	n.d.	n.d.
Ca (g/l)	0,27	Ca (g/kg)	n.d.	1,70
Mg (mg/l)	44,00	Mg (g/kg)	n.d.	0,80
Fe (mg/l)	120,00	Fe (g/kg)	526,00	201,00
Cu (mg/l)	6,00	Cu (g/kg)	17,00	16,00
Mn (mg/l)	12,00	Mn(g/kg)	13,00	5,00
Zn (mg/l)	12,00	Zn(g/kg)	18,00	13,00
Lípidos (g/l)	1,64	Lípidos (%)	18,00	n.d.
Polifenoles (g/l)	10,70	Fenoles (%)	1,20	1,60
Carbohidratos (g/l)	16,10	Carbohidratos (%)	9,60	6,30

Por enmienda orgánica entendemos un sustrato procedente de materiales carbonados de origen vegetal o animal, utilizada fundamentalmente para mantener o aumentar el contenido en materia orgánica del suelo y mejorar tanto sus propiedades físicas como su actividad química biológica. Según el Real Decreto 824/2005, de 8 de julio sobre productos fertilizantes, una enmienda orgánica de compost constituidos por materiales orgánicos biodegradables tiene que presentar un contenido mínimo de materia orgánica del 35%, una humedad entre 30 y 40% y una relación C/N menor de 20. Por ello numerosos autores han propuesto el uso del alpeorujo como enmendante de suelos agrícolas al ser un residuo rico en materia orgánica (Nogales *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 2002). El aprovechamiento del alpeorujo como fertilizante contribuiría a remediar la actual situación paradójica de la alta demanda de abonos orgánicos y la escasez de materia orgánica en los suelos de la cuenca Mediterránea, frente al fuerte

impacto medioambiental generado por la producción de alpeorujo por parte de las industrias oleícolas. Las pérdidas de humus por mineralización en los suelos españoles varían entre 200 y 2000 kg por hectárea y año. Las cifras menores corresponden a suelos con bajo contenido en materia orgánica y débil velocidad de mineralización (zonas áridas, suelos calizos, cultivo de secano, zonas frías, laboreo reducido, etc.) y las más altas a suelos profundos, con alto contenido en materia orgánica y elevada mineralización (zonas cálidas, húmedas, regadío, laboreo frecuente, etc.). Puesto que la mayor parte de la superficie de cultivos en España es en suelo calizo, en secano o con limitación hídrica, si se incorporara al suelo dicho residuo, el humus generado cubriría en muchos casos las pérdidas por mineralización y en determinadas rotaciones o cultivos sería excedentario.

Sin embargo, el alpeorujo es un material inestable con gran actividad microbiológica debido a la alta proporción de materia orgánica biodisponible que posee, por lo que, con el fin de poderlo usar en agricultura, se hace necesaria una estabilización previa de este subproducto. Podemos considerar el alpeorujo como un residuo orgánico biodegradable, al ser un subproducto de origen vegetal susceptible de transformarse por la acción de microorganismos aerobios o anaerobios y dar lugar a una enmienda orgánica.

3.2.2. Compuestos fenólicos del alpeorujo e importancia de su estudio

Los fenoles poseen uno o varios anillos aromáticos (fenoles monoméricos o polifenoles) con sustituyentes hidroxilos o derivados funcionales tipo éster, metiléster o glicósidos. Estos compuestos se encuentran formando parte de los tejidos de las plantas o como metabolitos primarios implicados en la síntesis de material esencial para estos, como la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, o bien intervienen como metabolitos secundarios con una función restringida y poco clara en el metabolismo general, ya que no son necesarios para la fotosíntesis y respiración pero son requeridos para el crecimiento de las plantas.

Los fenoles intervienen en el crecimiento de las plantas y se han relacionado estos con las auxinas y los ácidos abcísico e indolacético. Se ha descrito que algunos fenoles promueven el crecimiento de las plantas e inducen la dormancia en semillas mientras que otros en cambio inhiben la germinación de semillas, elongación radical, expansión de hojas, fotosíntesis, absorción de nutrientes y acumulación de materia seca en

vástagos y raíces de plantas, de ahí sus propiedades fitotóxicas (Rasmussen y Einhellig, 1977; Reynolds, 1989; Lyu y Blum, 1990; Lyu *et al.*, 1990). Los mecanismos por los que los fenoles causan toxicidad parecen estar relacionados con la narcosis polar de las células, el desacoplamiento de la oxidación, alteraciones de electrofilicidad, de hidrofobicidad y disociación y unión de H en las biomoléculas (Korte *et al.*, 2000). Entre las funciones de los fenoles destaca su papel como sustancias alelopáticas produciendo efectos beneficiosos o perjudiciales bien directa o indirectamente sobre otras plantas o como moléculas señal ya que inducen la respuesta de los mecanismos de defensa de la planta frente a estreses o ataque de patógenos (Li *et al.*, 1993). También se ha observado que los fenoles pueden afectar a los microorganismos de la rizosfera de la planta. Así los flavonoides, en procesos de simbiosis micorrícica, pueden aumentar o disminuir la germinación de las esporas en función de su concentración (Fries *et al.*, 1997). Se ha descrito también que los ácidos fenólicos pueden inhibir la colonización arbuscular (Pedersen *et al.*, 1991). El papel de los fenoles en las micorrizas parece ser un proceso complejo dependiente de múltiples factores como el tipo de fenol y concentración, así como del tipo de hongo micorrícico y de la etapa del desarrollo de la simbiosis (Scervino *et al.*, 2005a; Scervino *et al.*, 2005b). Los fenoles además forman parte de pigmentos como los antocianos que son los responsables de la coloración de frutos y residuos como las aceitunas y el alpeorujo. Estos además son los encargados de aportar la sensación de gusto en frutos, siendo los causantes del amargor del aceite de oliva o de las naranjas.

La composición fenólica de las aceitunas varía en función de su variedad, estado de madurez y condiciones climáticas en las que se ha desarrollado cada campaña (Romero *et al.*, 2004). En la aceituna aparecen componentes de tipo secoiridoide como la oleuropeína (formada por la unión del ácido elenólico, el hidroxitirosol y una molécula de glucosa), verbascósido y ligustrósido; grupos de compuestos fenólicos derivados del ácido cinnámico (ácido ferúlico, cafeico y p-cumárico) y del ácido benzoico (ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 4-hidroxibenzoico) y otra serie de fenoles como el catecol, metilcatecol, fenilalcoholes (tirosol, hidroxitirosol), flavonoides presentes en una concentración relativamente alta (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, rutina y quercetina) y pigmentos antocianos (cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido) responsables de la coloración violácea de las aceitunas maduras (Ryan *et al.*, 2002).

Introducción

En el aceite de oliva virgen los compuestos fenólicos mayoritarios son el tirosol, hidroxitirosol y sus formas conjugadas (oleuropeína, ligustrósido y verbascósido) y lignanos (pinoresinol y acetopinoresinol) (Brenes *et al.*, 1999; Brenes *et al.*, 2002). Los fenoles y sus derivados aparecen en la mayoría de los efluentes contaminantes de los procesos industriales y agrícolas dependiendo del proceso. Así mediante el sistema de centrifugación en dos fases el 98% del contenido fenólico de la aceituna se queda en el alpeorujillo quedando un 2% en el aceite de oliva (Vierhuis *et al.*, 2001). El alpeorujillo contiene una gran variedad de compuestos fenólicos diferentes por su peso molecular, posee compuestos de peso molecular bajo (un anillo aromático con uno o más grupos sustituyentes) y compuestos fenólicos complejos de alto peso molecular (varios anillos aromáticos condensados con algunos grupos sustituyentes). Los principales fenoles detectados en el alpeorujillo son fenilalcoholes como el hidroxitirosol y p-tirosol, derivados del ácido cinnámico (ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico), ácido vainillílico y vainillina (Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Sampedro *et al.*, 2004a).

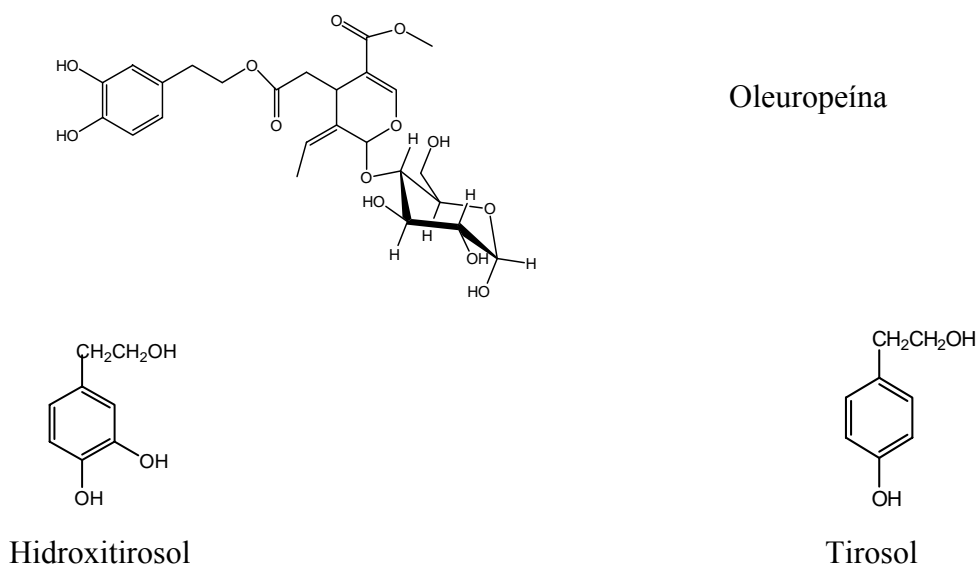


Fig. 3. Estructura de los fenoles presentes en el alpeorujillo con poder antioxidante.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que los fenoles representan la fracción más recalcitrante del alpechín y alpeorujillo con importantes propiedades fitotóxicas (Capasso *et al.*, 1992). Sin embargo estos fenoles, principalmente aquellos que también están presentes en el aceite de oliva, como son el hidroxitirosol, el tirosol y la oleuropeína (Fig. 3) tienen múltiples efectos biológicos, por su poder antioxidante

interviniendo en la prevención del cáncer y de enfermedades coronarias (Angerosa *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001), sus propiedades nutricionales (Galli y Visioli, 1999) y las propiedades organolépticas que aporta al aceite de oliva. Por tanto el alpeorujo puede usarse como fuente potencial de biofenoles de alto interés por sus propiedades beneficiosas para la salud humana con diferentes usos dentro de la industria farmacéutica y alimentaria (Aragón y Palancar, 2001). Al mismo tiempo este uso del alpeorujo resolvería un problema medioambiental ya que disminuiría el contenido fenólico de este y por tanto su efecto fitotóxico, con lo que podría plantearse su uso como fertilizante o enmendante orgánico.

3.2.3. Usos y aprovechamientos del alpeorujo

Desde la aparición del alpeorujo como nuevo residuo en la extracción de aceite mediante la tecnología de dos fases se han realizado numerosos estudios encaminados al aprovechamiento de dicho residuo. Los usos del alpeorujo más importantes que se conocen son:

1. *Aceite de alpeorujo*

El alpeorujo obtenido en las almazaras se transporta a las industrias orujeras con el fin de obtener aceite de orujo. Este alpeorujo húmedo se vacía en balsas de desecación en las que se mantiene en torno a los 8 o 10 días y posteriormente se seca en secaderos rotativos con aire caliente a 400 °C hasta obtener un residuo con un 5% de humedad. A continuación se extrae el aceite de orujo con n-hexano, obteniéndose el alpeorujo seco y extractado u orujillo como residuo final que contiene muy poco aceite y una humedad del 10-13%. Tras el cambio en la metodología de extracción, las orujeras se encuentran con un residuo nuevo más húmedo (62%) con cada vez menos aceite que extraer y un alto contenido en azúcares. El secado de este nuevo residuo es difícil ya que se produce la caramelización de los azúcares que contiene, compuestos no deseados como hidrocarburos policíclicos aromáticos y bolsas de aire que generan explosiones (Arjona *et al.*, 2005). Dadas las dificultades en el secado y extracción del aceite de orujo y los problemas que conlleva, en algunos sitios se está empezando a prescindir de esta alternativa y destinar el alpeorujo directamente a la producción de biocombustible (Celma *et al.*, 2002).

2. Energía

En los últimos años se están empezando a utilizar fuentes de energía alternativa, aparte del petróleo y gas natural en las plantas de cogeneración de energía con residuos orgánicos procedentes de la agricultura (restos de poda) y la agroindustria (orujos de la agroindustria olivarera o vinícola). La cogeneración de energía es un proceso mediante el cual se obtiene energía eléctrica y/o mecánica y energía térmica a partir de una misma fuente de energía. El alpeorujillo seco y extractado se puede utilizar como combustible para la cogeneración de energía eléctrica y térmica por combustión ya que presenta un poder calorífico de 400 Kcal/kg (Masghouni y Hassairi, 2000; Caputo *et al.*, 2003). En algunas orujeras se han introducido estas plantas de cogeneración y la energía que obtienen la utilizan para el secado del alpeorujillo húmedo y el autoabastecimiento de energía eléctrica. El inconveniente de este aprovechamiento del alpeorujillo es la alta producción de cenizas como residuo último de la combustión.

El alpeorujillo también puede utilizarse en la producción de biogás (una mezcla de CH₄ y CO₂) a partir de un proceso biotecnológico de digestión anaeróbica (Tekin y Dalgic, 2000) o para la producción de metano (Borja *et al.*, 2003). Otra alternativa de producir energía a partir de alpeorujillo es mediante el método físico-químico que propone Jurado *et al.* (2003) por el que a partir de biomasa de alpeorujillo se obtiene un gas sintético llamado “syngas” formado por una mezcla de CO₂ y H₂ del que se obtiene combustible sintético.

3. Abono agrícola

El alpeorujillo se puede utilizar como abono de suelos agrícolas por su alto contenido en materia orgánica y presencia de micronutrientes. Sin embargo, debido a los niveles elevados de fenoles del alpeorujillo que originan síntomas de fitotoxicidad en los cultivos y a que el uso directo de este en el suelo tiene un efecto perjudicial en la estabilidad estructural del mismo, se opta por el tratamiento de dicho residuo antes de su uso para eliminar su toxicidad (Ruiz *et al.*, 1997).

La valorización del alpeorujillo mediante compostaje está siendo objeto de estudio en los últimos años debido a que las características físicas del mismo hacen difícil el proceso. Se han descrito que para que no se produzca compactación en el proceso, por las propiedades semisólidas del alpeorujillo, es necesario emplear agentes descompactantes como hojas de olivo, paja, residuos de algodón, serrín de álamo y astillas de madera (Cegarra *et al.*, 2000; Filippi *et al.*, 2002). Sus propiedades físicas

también lo hacen un sustrato difícil para la aireación de las pilas de compost por lo que se han realizado diferentes estudios para optimizar el compostaje (Cayuela *et al.*, 2006). En todos los casos el alpeorajo compostado mostró un alto grado de humificación, sin efectos fitotóxicos y con un alto contenido en nutrientes minerales, representando este tipo de tratamientos una estrategia alternativa para el reciclaje de estos subproductos (García-Gómez *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2006b; Albuquerque *et al.*, 2006c). Otra forma de compostar el alpeorajo puede ser mediante el uso de lombrices epigeicas ya que este residuo posibilita el crecimiento y reproducción de las mismas. Los productos obtenidos mediante vermicompostaje presentaron un menor contenido en compuestos fitotóxicos y baja relación C/N, aunque estos resultados fueron más patentes cuando se mezcló el alpeorajo con otros residuos (Nogales *et al.*, 1999; Saavedra *et al.*, 2006).

Sin embargo el tiempo necesario para llevar a cabo estos compostajes es largo por lo que se están buscando alternativas para acelerar dicho proceso. Estudios recientes demuestran que la incubación del alpeorajo con determinados hongos saprobios disminuye y en algunos casos eliminan la fitotoxicidad de este debido principalmente a la degradación y/o polimerización de fenoles presentes en este residuo en un período de cinco meses (Sampedro *et al.*, 2005; Sampedro, 2005).

4. Productos de alto valor añadido

El alpeorajo contiene compuestos de interés para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Es un residuo muy rico en hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína, potentes antioxidantes que se pueden extraer del residuo por medio de tratamiento térmico al vapor (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002). El alpeorajo se puede utilizar para la producción de pectina, compuesto de gran interés en la industria alimentaria ya que es usada como agente gelificante, estabilizante y emulsionante (Cardoso *et al.*, 2003). Además también se ha estudiado la mezcla de alpeorajo con polímeros termoplásticos para la fabricación de contenedores (Siracusa *et al.*, 2001).

5. Otras formas de valorización

El alpeorajo se puede usar en la fabricación de piensos concentrados para la alimentación de especies de rumiantes poco sensibles a la presencia de fenoles como el ganado ovino y caprino (Molina y Nefzaoui, 1996). Sin embargo, dada la alta proporción de fibras poco digeribles y el bajo contenido en proteínas de estos piensos,

se recomienda la aplicación de un suplemento proteico (Molina y Nefzaoui, 1996; Molina *et al.*, 2003; Martín-García *et al.*, 2004).

Se han realizado estudios de aplicación del alpeorujo como herbicida natural, ya que debido a sus propiedades fitotóxicas puede emplearse en el marco del control integrado contra plantas devastadoras de cultivos como el *Orobanche crenata* Forsk (Kaddour *et al.*, 2005). Además el alpeorujo puede inmovilizar pesticidas como la simazina o insecticidas como el imidacloprid en el suelo para reducir el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas (Albarrán *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2004). También se ha descrito la posibilidad de utilizar el alpeorujo como material absorbente de metales pesados (Pagnanelli *et al.*, 2002).

Por otro lado las almazaras están empezando a separar los huesos presentes en el alpeorujo debido al aumento de su mercado no sólo como combustible, sino por su uso como abrasivo, materia prima para la obtención de carbón activo (Güneysu *et al.*, 2004) e incluso para favorecer el compostaje de otros materiales orgánicos (García-Gómez *et al.*, 2005).

4. Hongos transformadores de alpeorujo

Los hongos constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos de vida heterotrófica. La inmensa mayoría presenta una digestión externa o lisotrófica gracias a la difusión de sustancias enzimáticas apropiadas que les hace susceptibles de degradar la materia orgánica de distintos sustratos o residuos. Los grupos taxonómicos más importantes en la degradación de la materia orgánica son los hongos de las clases *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* todos ellos pertenecientes a la Div. *Eumycota*. En el grupo de los Zigomicetes se incluyen hongos del orden *Mucorales* que son incapaces de degradar polisacáridos como la celulosa y lignina, pero que solubilizan azúcares en competencia con las bacterias del suelo y otros que contienen quitinasas, enzima que degrada el componente mayoritario de la pared celular de hongos e insectos. Perteneciente a este grupo destaca también el orden *Glomales* entre los que se incluyen los hongos endomicorrícicos capaces de formar una simbiosis mutualista con plantas superiores e intervenir en procesos de ciclado de la materia orgánica en el suelo por medio de la captación de fósforo. Los Deuteromicetes u hongos imperfectos comprenden un grupo muy heterogéneo morfológicamente,

enzimáticamente muy versátiles y conocidos por intervenir en procesos de podredumbre como los del grupo de *Paecilomyces*. Los grupos Ascomicetes y Basidiomicetes también son importantes en procesos de descomposición ya que producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas y ligninolíticas. Dentro de los Ascomicetes se incluyen hongos tan conocidos como *Penicillium* y *Aspergillus* y en los Basidiomicetes aparecen los denominados hongos degradadores de madera productores de enzimas lignocelulósicas como la lacasa, la lignina peroxidasa o manganeso peroxidasa.

Los hongos debido a su diversidad metabólica poseen un enorme potencial en aplicaciones biotecnológicas. En los últimos años, con el desarrollo de la biotecnología los microorganismos y sus enzimas han recibido una especial atención por su aplicabilidad en biodegradación. Dado nuestro interés en el estudio de los hongos en el ámbito de la degradación de sustancias optaremos por una clasificación ecofisiológica de los hongos en función de su hábitat y del lugar de adquisición de sus nutrientes y energía. De acuerdo con esta clasificación podemos distinguir entre hongos saprobios del suelo y hongos degradadores de madera.

4.1. Hongos saprobios del suelo

La importancia de los hongos saprobios del suelo radica principalmente en el papel que desempeñan en la descomposición de la materia orgánica siendo esenciales en la movilización, almacenamiento y liberación de nutrientes a partir del material vegetal en ecosistemas terrestres. Estos hongos intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica del suelo por medio de degradaciones enzimáticas aunque también llevan a cabo reacciones de condensación de esta materia originando la formación del complejo húmico (Lahdesmaki y Piispanen, 1988).

Son hongos ubiquistas debido a la gran diversidad de enzimas que producen y a sus estrategias de supervivencia específicas como el crecimiento a través de hifas y la capacidad para producir esporas de resistencia en condiciones adversas. Utilizan una gran variedad de fuentes carbonadas desde azúcares sencillos hasta pectinas, celulosa o lignina. Como fuentes nitrogenadas emplean amonio o nitratos aunque también pueden utilizar proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados. Estos hongos pueden producir enzimas importantes para la degradación como proteasas, amilasas,

pectinasas, celulasas, ligninasas y xilanasas aunque también son capaces de producir en menor cantidad quitinasas, cutinasas, fitasas y fosfatasas que también juegan un papel importante en la degradación de materia orgánica.

Este tipo de microorganismos y sus enzimas se emplean en procesos biotecnológicos de biodegradación de residuos agrícolas, agroindustriales o de la industria alimentaria (Kapoor *et al.*, 1978; Petre *et al.*, 1999) y en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el suelo (Potin *et al.*, 2004). Estos hongos también se emplean en el tratamiento de efluentes industriales nitrocelulósicos (Souza *et al.*, 2005), en la industria papelera degradando papel mediante la producción de enzimas hidrolíticas que posteriormente serán empleadas con otros fines (Das *et al.*, 1997), como degradadores de fibras textiles y para blanqueo de papel a través de celulasas y xilanasas (Bruhlmann *et al.*, 1994). Algunos autores han determinado la capacidad de ciertos hongos del género *Penicillium* para metabolizar fenoles (Hofrichter y Scheibner, 1993; Hofrichter *et al.*, 1995). Recientemente se ha descrito que diversos hongos del género *Fusarium* son capaces de detoxificar el alpeorujó (Martín *et al.*, 2002; Sampedro *et al.*, 2005).

4.2. Hongos saprobios de la madera

A este grupo de hongos saprobios pertenecen los hongos de la podredumbre blanda, parda y blanca que se caracterizan por crecer en madera provocando su pudrición. Los hongos de la podredumbre blanda y parda atacan fundamentalmente a la celulosa mientras que los de la podredumbre blanca a la celulosa y la lignina.

Hongos de la podredumbre blanda

Estos hongos atacan poco o nada a la lignina aunque sí a la celulosa y hemicelulosa por lo que aparecen en las etapas más tempranas del proceso de pudrición de la madera. Requieren una fuente de nitrógeno alta para producir la podredumbre que generalmente obtienen del suelo. Se conocen unos 300 géneros de hongos de la podredumbre blanda pertenecientes a los Ascomycetes y Deuteromycetes entre los que destacan *Cephalosporium*, *Acremonium* y *Paecilomyces*.

Hongos de la podredumbre parda

Estos hongos degradan fundamentalmente compuestos celulósicos y hemicelulósicos provocando una despolimerización de estos polisacáridos y en los residuos lignocelulósicos generando una acumulación de lignina oxidada que representa una fuente potencial de compuestos aromáticos en la materia orgánica del suelo y da lugar a un color pardo al que deben su nombre (Buswell y Odier, 1987). Este grupo de hongos es el menos numeroso de los hongos de la podredumbre de la madera (7%), pertenecen todos ellos al grupo de los Basidiomicetes y destacan géneros como *Fomes* o *Poria* (Eriksson *et al.*, 1990).

Hongos de la podredumbre blanca

Los hongos de la podredumbre blanca son un grupo ecofisiológicamente muy diverso pertenecientes la mayoría a los Basidiomicetes y en menor representación a los Ascomicetes. Estos hongos se caracterizan por degradar preferentemente la lignina y acumular celulosa y hemicelulosa lo que le da a la madera un aspecto blanquecino al que debe su nombre (Pointing, 2001). La habilidad para degradar lignina por estos hongos se asocia con la liberación de enzimas extracelulares como la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y la lacasa así como oxidasas que generan H₂O₂ necesario para la actividad peroxidasa (Hatakka, 1994; Tuor *et al.*, 1995). Recientemente se ha encontrado en alguno de estos hongos un enzima híbrida entre la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, la peroxidasa versátil, que también interviene en los procesos de ligninolisis (Banci *et al.*, 2003).



Pycnoporus cinnabarinus (Jacq.) Fr



Trametes versicolor, L.

Fig. 5. Hongos de la podredumbre blanca.

Estas enzimas se liberan durante el metabolismo del hongo y generan radicales intermediarios que llevan a cabo una serie de reacciones oxidativas entre las que se incluyen oxidaciones, hidroxilaciones, polimerizaciones fenólicas, dimerizaciones fenólicas y dimetilaciones. Los productos más simples de la degradación de la lignina pueden penetrar en las hifas fúngicas e incorporarse a las rutas catabólicas intracelulares.

Los hongos de la podredumbre blanca están siendo ampliamente investigados por su aplicabilidad biotecnológica. Se ha descrito que las enzimas producidas por estos hongos son capaces de degradar una gran diversidad de polímeros orgánicos complejos, algunos contaminantes ambientales con una estructura química similar a la lignina e incluso compuestos xenobióticos gracias a la alta inespecificidad del sustrato. Estos hongos son capaces de degradar compuestos xenobióticos como los desechos de municiones (trinitrotolueno, nitroglicerina), pesticidas, compuestos organoclorados, organofosfatos, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), efluentes de industrias blanqueadoras de papel, tintes sintéticos, polímeros sintéticos, creosota y pentaclorofenoles (PCP) (Majcherczyk *et al.*, 1998; Pointing, 2001; Keum y Li, 2004). Además estos hongos tienen la capacidad de biodegradar residuos como el alpechín y alpeorujó causando una disminución en la coloración, contenido fenólico y fitotoxicidad (Madrid *et al.*, 1995; D'Annibale *et al.*, 1998; Kissi *et al.*, 2001; Sampedro *et al.*, 2004a).

5. Residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulósicos engloban al conjunto de materiales constituidos por celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina en diferente proporción según la procedencia (Fengel y Wegener, 1984). Estos residuos de naturaleza lignocelulósica se pueden agrupar en residuos industriales (derivados de la fabricación de pasta de papel y transformados de madera), residuos forestales (procedentes de la limpieza y silvicultura), residuos agrícolas (cultivos, frutos secos, cereales y excedentes de cosechas) y residuos urbanos (papeles, cartones y similares). Estos materiales lignocelulósicos, que generalmente constituyen desechos, pueden ser revalorizados y utilizados como materia prima de numerosos productos químicos y biológicos que están constituidos por los componentes que integran a estos residuos (celulosa, pectina). La

transformación y descomposición de estos materiales en productos derivados, mediante hidrólisis y oxidaciones enzimáticas, es muy importante para su bioconversión e incorporación en el ciclo del carbono.

Dado que el alpeorajo se puede considerar como un material lignocelulósico con gran interés para su utilización tanto energética, agrícola o con fines industriales realizaremos una revisión de los principales componentes de dicho residuo.

Celulosa

La celulosa es el componente mayoritario de los materiales lignocelulósicos y está constituido por unidades de β -glucosa unidas entre sí por enlaces β 1-4. Debido a su configuración molecular, las cadenas de celulosa tienden a agregarse formando las estructuras denominadas microfibrillas que a su vez se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno.

Pectina

La pectina es un polisacárido con una estructura compleja constituido fundamentalmente por cadenas lineales de moléculas de ácido D-galacturónico, que unidas entre sí constituyen el ácido poligalacturónico y además llevan entremezcladas moléculas de ramnosa, arabinosa, galactosa, xilosa, mucosa o ácido glucurónico. Numerosos estudios muestran que la mayoría de los residuos agroindustriales contienen pectina, la cual usan como fuente carbonada diversos microorganismos (Botella *et al.*, 2004).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es un compuesto aun mal definido que aparece en los residuos en forma amorfa o paracristalina con un grado de complejidad intermedio. El término hemicelulosa incluye una vasta mezcla de polisacáridos heterogéneos como el xiloglucano, arabinogalactano, galactomanano, manano y glucomanano formados fundamentalmente por xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido galacturónico. Todas las hemicelulosas poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos, casi siempre mediante enlaces β 1-4, de las que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar. Poseen alguna característica estructural que les impide formar agregados como las

cadena de celulosa, aunque sí pueden cocrystalizar con éstas por medio de puentes de hidrógeno.

El xiloglucano es el polisacárido hemicelulósico más importante en residuos vegetales de mono y dicotiledóneas. El esqueleto del xiloglucano es idéntico al de la celulosa pero unido principalmente a residuos de xilosa y en menor cantidad a moléculas de galactosa, arabinosa y mucosa.

Lignina

La lignina, junto con la celulosa y la hemicelulosa es el principal componente de las plantas y la forma más abundante de carbono en la biosfera. La lignina es un polímero tridimensional amorfo muy heterogéneo, de naturaleza no polisacáridica que está constituida por unidades de fenilpropano unidas por distintos tipos de enlaces. Dada su compleja y heterogénea estructura hacen que sea un polímero difícilmente degradable (Kirk y Farrel, 1987). Se forma por deshidrogenación enzimática de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico seguida por una polimerización, que al no estar controlada enzimáticamente y dado que los radicales pueden reaccionar unos con otros en una gran variedad de formas hace que dicho polímero no tenga una forma única. La lignina contiene subestructuras fenólicas (con grupos hidroxilos fenólicos en el anillo aromático) y no fenólicas aunque se ha descrito que el 90% de la lignina natural son subestructuras no fenólicas (Geng y Li, 2002). Algunos autores sugieren que la presencia de lignina en las plantas se debe a la ausencia de mecanismo excretorio, de forma que esta no sería más que una forma de detoxificación de sustancias fenólicas. La lignina además se considera una importante precursora de las sustancias húmicas teniendo un papel muy importante en el ciclo del carbono.

6. Enzimas implicadas en procesos de degradación de materiales lignocelulósicos

Las enzimas implicadas en la degradación de materiales lignocelulósicos abarcan un amplio grupo entre las que destacan las enzimas que atacan directamente a componentes de la pared celular (celulosa, pectina, hemicelulosa y lignina) y otras que cooperan en su degradación (Leonowicz *et al.*, 1999).

Celulasas

Las celulasas son un conjunto de β 1-4 glucanasas que rompen enlaces β glucosídicos. Dentro de este grupo de enzimas destacan la endo-1,4- β -glucanasa, dos tipos de exo-1,4- β -glucanasas (celobiohidrolasa y glucohidrolasa) y la β -glucosidasa. Las endoglucanasas rompen enlaces internos de las cadenas polisacarídicas produciendo celulosa, celobiosa y fracciones de alto peso molecular mientras que las exohidrolasas actúan en los extremos finales de las cadenas liberando disacáridos como la celobiosa. Dada la naturaleza cristalina de la celulosa su degradación es muy lenta.

Se ha demostrado la producción de celulasas por hongos saprobios de la madera como *Phanerochaete chrysosporium* (Lawoko *et al.*, 2000), *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Dueñas y Martínez, 1996) o *P. ostreatus* (Baldrian *et al.*, 2005). También los hongos saprobios del suelo como *Trichoderma*, *Fusarium* y *Penicillium* utilizan la celulasa para degradar celulosa y usarla como fuente de carbono (Baig *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2005).

Pectinasas

Las pectinasas engloban a un grupo de enzimas despolimerasas que catalizan la ruptura de la pectina. Estas enzimas hidrolizan enlaces glucosídicos α (1-4) de las moléculas de ácido galacturónico en los enlaces terminales de las cadenas pécticas (exopectinasas) liberando unidades de ácido galacturónico o bien lo hacen en varios puntos al azar (endopectinasas) liberando cadenas más cortas de ácido galacturónico.

Se ha demostrado la presencia de estas enzimas en hongos patógenos pertenecientes al género *Fusarium* para romper la pared celular de las plantas a las que atacan (Bonnin *et al.*, 2002). La mayoría de los residuos agroindustriales contienen pectinas que constituyen una fuente nutritiva para multitud de microorganismos, por ello algunos autores han empleado residuos agrícolas, entre ellos residuos de caña de azúcar y alpechín, como fuente carbonada para la producción de endopectinasas por hongos saprobios como *Penicillium* y *Aspergillus* (Hart *et al.*, 1991; Bai *et al.*, 2004).

Hemicelulasa

La hemicelulosa se degrada por enzimas como la endo- β -1,4-xiloglucanasa, endo-1,4- β -xilanasas, β -xyloxidasa, α -glucuronidasa, α -L-arabinofuranosidasa, 1,4- β -mannanasa, β -mannosidasa, β -glucosidasa, α -galactosidasa y acetilesterasa. Todas estas enzimas son capaces de hidrolizar los polímeros de hemicelulosa en sus

correspondientes monosacáridos y disacáridos. La enzima endo- β -1,4-xiloglucanasa hidroliza el xiloglucano liberando fracciones de bajo peso molecular a partir de los extremos de la cadena de polisacáridos (Fry, 1995).

Se ha observado la presencia de estas enzimas en hongos saprobios como *Pl. ostreatus*, *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus* o *Wardomyces inflatus* (Tribak *et al.*, 2002) y en otros como *Fusarium oxysporum* y *Ph. chrysosporium* cuando crecen en residuos de caña de azúcar (Cheilas *et al.*, 2000; Khalil, 2002). También se ha detectado producción de xilanasas en hongos como *Aspergillus niger* o *Penicillium chrysogenum* cultivados en residuos agroindustriales de arroz, caña de azúcar o remolacha (Abdel-Sater y El Said, 2001).

Enzimas degradadoras de la lignina

La ligninólisis o despolimerización de la lignina es un proceso complejo llevado a cabo en la naturaleza por microorganismos ligninolíticos (algunas bacterias pero principalmente hongos ligninolíticos). Es un proceso oxidativo, multienzimático e inespecífico en el que participan enzimas ligninolíticas que junto con los metabolitos y los radicales libres generados posteriormente sufren diferentes reacciones conduciendo a la despolimerización de la lignina (Higuchi *et al.*, 1990). Parece existir una degradación preferencial de las enzimas ligninolíticas por las unidades fenólicas de la lignina y a continuación las no fenólicas (Camarero *et al.*, 1994). Las investigaciones sobre la biodegradación de la lignina han proliferado en las últimas décadas en respuesta a sus múltiples aplicaciones potenciales en distintas áreas.

En la degradación de la lignina intervienen enzimas oxidorreductasas del tipo peroxidasa como la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil y fenoloxidasas como la lacasa. Otras enzimas extracelulares implicadas en la degradación de la lignina y que cooperan con las anteriores son oxidasas que generan H_2O_2 y deshidrogenasas asociadas al micelio que reducen los compuestos derivados de la lignina, en este grupo se incluyen la aril-alcohol oxidasa, glioxal oxidasa, aril-alcohol deshidrogenasa y quinona-reductasa (Martínez *et al.*, 2005). Las enzimas oxidorreductoras, entre las que destacan fenoloxidasas y peroxidasas, están implicadas en la degradación de una extensa variedad de compuestos contaminantes por la oxidación de compuestos aromáticos como fenoles, sustituyentes fenólicos, anilinas, PAHs, compuestos no aromáticos incluidos alcanos y sus sustituyentes.

Fenoloxidasas

La lacasa es una de las principales enzimas del tipo fenoloxidasa que esta ampliamente distribuida en plantas superiores, hongos y algunas bacterias (Mayer y Harel, 1979; Duran *et al.*, 2002). Su mecanismo de acción se basa en la oxidación de un sustrato reducido que provoca la formación de un radical libre (catión) después de transferir un electrón a la lacasa. Los radicales generados son los que están implicados en reacciones de ataque a la lignina (Gianfreda *et al.*, 1999). Algunas investigaciones muestran indicios de que las lacasas oxidan solamente las subunidades fenólicas de la lignina, que son las más fáciles de oxidar pero las menos abundantes (10-15%), y éstas interaccionan con los componentes no fenólicos a través de los radicales formados (D'Acunzo y Galli, 2003). Sin embargo se ha podido demostrar que las lacasas pueden oxidar compuestos fenólicos y aminas aromáticas usando el oxígeno como aceptor de electrones y compuestos no fenólicos en presencia de mediadores (Bourbonnais y Paice, 1990). Entre los mediadores destacan el ABTS y el HBT que son compuestos de bajo peso molecular que, oxidados por la lacasa, forman radicales estables que son esenciales en la oxidación de compuestos no fenólicos (Martínez *et al.*, 1994). En los hongos este enzima puede ser parcialmente constitutivo o estar inducido por la presencia de determinados sustratos.

Las lacasas se caracterizan por tener una baja especificidad de sustrato y porque su eficiencia catalítica varía en función del pH, grado de aireación, agitación, fuentes de N y presencia de inductores como el alcohol verátrico, compuestos fenólicos como vainillina (De la Rubia *et al.*, 2002) o microelementos como el Cu (Saparrat *et al.*, 2002). Además estas enzimas actúan de forma diferente en función de la molécula a degradar, así la transformación de fenoles depende del peso molecular del sustituyente y de la posición del anillo aromático respecto a su grupo OH. Algunos estudios indican que esta enzima no se inhibe en agitación, lo cual facilita la incubación de determinados extractos con lacasa (Wesenberg *et al.*, 2003). A pesar de estar poco claro el funcionamiento de las lacasas hay autores que afirman que el efecto de las fenoloxidasas es la polimerización de fenoles (Youn *et al.*, 1995) mientras que las peroxidasas son responsables de la despolimerización, sin embargo cada día más estudios se inclinan a afirmar que las fenoloxidasas llevan a cabo tanto polimerizaciones como despolimerizaciones oxidativas (Tien y Kirk, 1983; Gianfreda *et al.*, 1999).

Las lacasas se emplean en múltiples procesos de biorremediación, degradación de herbicidas, pesticidas y compuestos xenobióticos como hidrocarburos policíclicos aromáticos, alquenos, clorofenoles, carbazoles, fluorenos etc., además de su uso en el blanqueo de pastas de papel y en la decoloración de una amplia variedad de tintes sintéticos (Grey *et al.*, 1998; Mayer y Staples, 2002; Baldrian, 2006). Junto con su capacidad oxidativa, se ha observado que la lacasa puede inmovilizar compuestos fenólicos y anilinas del suelo mediante su unión al complejo húmico de este lo que conlleva disminución de su biodisponibilidad y reducción de la fitotoxicidad (Tatsumi *et al.*, 1994). Además la lacasa producida por hongos ligninolíticos constituye una herramienta importante para la biorremediación de residuos agroindustriales como residuos de caña de azúcar, alpechín y alpeorajo. Estudios realizados con lacasas purificadas de los hongos *Pha. chrysosporium*, *Chalara paradoxa*, *Lentinula edodes* mostraron que estas juegan un papel muy importante en la decoloración y detoxificación del alpechín (Robles *et al.*, 2000; Tsioulpas *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2004). Por otro lado se ha descrito que incubaciones directas de los hongos en alpechín producen disminución del contenido fenólico y coloración asociados a una disminución de la fitotoxicidad del residuo, dada la inducción que provocan los componentes fenólicos presentes en el alpechín sobre la producción de este enzima por los hongos (Pérez *et al.*, 1998). También se ha demostrado la presencia de actividad lacasa en el alpeorajo cuando dicho residuo se incubó durante 2 y 20 semanas con determinados hongos saprobios que provocaron una polimerización de los fenoles presentes en dicho residuo y una disminución de la fitotoxicidad de este (Sampedro *et al.*, 2005).

Peroxidasas

Las peroxidasas son oxidoreductasas implicadas en la biodegradación de la lignina que catalizan oxidaciones tras su activación con H_2O_2 y en presencia de mediadores. El H_2O_2 se genera por oxidasas extracelulares que reducen el O_2 a peróxido de hidrógeno en una reacción catalítica. Las tres peroxidasas implicadas en la degradación de la lignina por hongos son la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa (MnP) y la recientemente descubierta peroxidasa versátil (Banci *et al.*, 2003). Estas enzimas oxidan subestructuras fenólicas y no fenólicas de la lignina por captación de un electrón y consecuente generación de un catión. La lignina peroxidasa ataca a las subunidades de la lignina no fenólicas en cambio la MnP puede actuar como un oxidante difusible oxidando subunidades fenólicas y no fenólicas (Jensen *et al.*, 1997).

Algunos estudios han puesto de manifiesto que la lignina peroxidasa no es una característica ampliamente distribuida entre los hongos de la podredumbre blanca, de hecho la mayoría de ellos solo producen lacasa y usualmente MnP (Hatakka, 1994).

El mecanismo de acción de la MnP se caracteriza por la oxidación de Mn, un elemento ubiquista en el suelo y en los compuestos lignocelulósicos, de Mn (II) a Mn (III). Este Mn III es acomplejado posteriormente por un ácido orgánico generalmente producido por los hongos y de esta forma actúa como oxidante difusible de lignina (Gold *et al.*, 2000). Al igual que las lacasas la actividad catalítica de esta enzima varía en función de la fuente de nitrógeno, presencia de inductores como el Mn que activa su funcionamiento o la agitación que parece tener un efecto negativo en su actividad. Como sustratos utiliza fenoles, aminas, compuestos aromáticos no fenólicos, ácidos carboxílicos, tioles y ácidos grasos insaturados, con los que interaccionan y generan nuevos radicales (Hatakka, 1994).

La MnP generalmente se emplea junto con la lacasa y la lignina peroxidasa en procesos de biorremediación ya que cada enzima presenta modo de acción, potencial redox y requerimientos catalíticos diferentes produciendo por tanto una degradación más completa. A pesar de su valor biotecnológico, la aplicación de las peroxidases ha sido debatida debido a su baja estabilidad operacional (Colonna *et al.*, 1999).

Son múltiples los hongos ligninolíticos en los que se ha detectado la producción de MnP (Hofrichter, 2002), en algunas especies de hongos como *Pl. ostreatus* o *L. edodes* es la única peroxidasa producida, en cambio otras especies de hongos como *Phlebia radiata*, *T. versicolor* producen además lignina peroxidasa (Leatham, 1986; Hatakka, 1994). El potencial degradativo de la MnP, al igual que la lacasa no está limitado a la lignina, sino que se ha estudiado su posible uso en contaminantes orgánicos como tintes sintéticos (Boer *et al.*, 2004), decoloración de efluentes de pasta de papel (Michel *et al.*, 1991) y xenobióticos persistentes como antracenos (Eibes *et al.*, 2005) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Baborova *et al.*, 2006). El alpechín se ha empleado como medio de cultivo de *Panus tigrinus* para la producción de lacasa y MnP (Fenice *et al.*, 2003). Por otro lado se ha observado que la actividad MnP de *Ph. flavido-alba* provocó decoloración de residuos de papel y del alpechín (Pérez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1998).

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Alpeorujos seco y extractado

1.1. Características del alpeorujos

El orujos resultante del proceso de extracción del aceite de oliva utilizando el sistema continuo de dos fases, tras su secado en secaderos rotativos con aire caliente a 400 °C se somete a una segunda extracción con n-hexano originando aceite de orujos y un residuo denominado alpeorujos seco y extractado (DOR) con un porcentaje de aceite muy bajo y una humedad del 10-13%.

Se ha utilizado el alpeorujos seco y extractado procedente de la empresa oleícola Sierra Sur S.A. (Granada). El alpeorujos, antes de su utilización, se autoclavó 3 veces en ciclos de 20 min a 120 °C y se conservó a 4 °C hasta su posterior utilización.

1.2. Extracciones físicas del alpeorujos

Para el estudio de los componentes fitotóxicos del alpeorujos se llevaron a cabo extracciones físicas diferentes, tanto por la metodología empleada como por los disolventes utilizados.

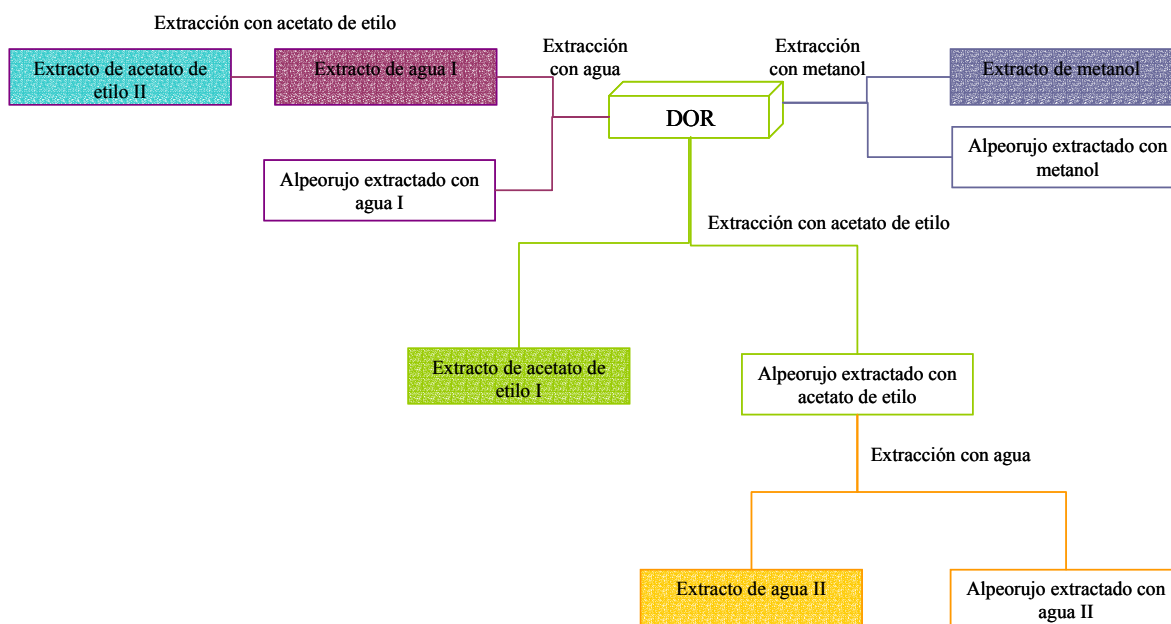
1.2.1. Extracciones sólido-líquido con extractor rotativo orbital

Inicialmente se realizaron extracciones de alpeorujos mediante un extractor rotativo orbital con: (1) agua, (2) metanol y (3) acetato de etilo siguiendo el esquema A1. Tras dichas extracciones se obtuvieron tres fracciones sólidas: sólido extractado con agua, con metanol y con acetato de etilo y tres extractos líquidos: extracto de agua, de metanol y de acetato de etilo. Los extractos de alpeorujos se obtuvieron mezclándose con los respectivos solventes durante 8 h en proporción 1:2 (p:v). Transcurrido este tiempo las mezclas resultantes se filtraron a través de una gasa, se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 min y los sobrenadantes se filtraron con papel de filtro. El extracto acuoso resultante se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización. Los extractos metanólicos

y de acetato de etilo tras la centrifugación y filtración se evaporaron en un rotavapor hasta su sequedad y el sólido obtenido se resuspendió en agua destilada en el mismo volumen de partida. Debido a la apolaridad del extracto de acetato de etilo, para su resuspensión en agua o medio de cultivo, fue necesario agitar la mezcla vigorosamente. Los sólidos resultantes de la extracción con agua, metanol y acetato de etilo tras secarlos durante 24 h bajo campana de extracción al aire se guardaron a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

Al extracto de agua obtenido tras esta primera fase de extracción orbital se le realizó posteriormente una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, que se describirá posteriormente. Asimismo, el sólido extractado con acetato de etilo también se volvió a extraer con agua obteniéndose un nuevo extracto de agua y un nuevo sólido extractado con agua.

Esquema A1. Esquema del proceso de extracción del alpeorujó seco y extractado con extractor rotativo orbital.

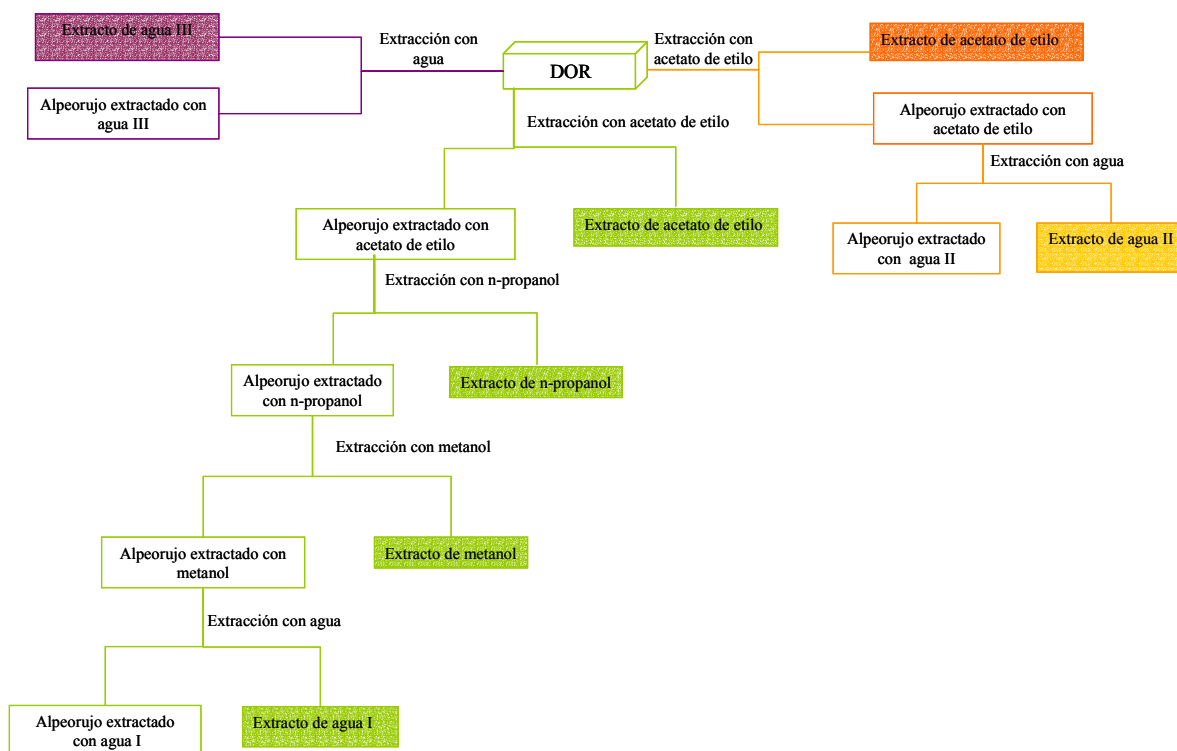


1.2.2. Extracciones sólido-líquido con Soxhlet

Se realizaron tres tipos de extracciones sólido-líquido mediante Soxhlet (Pobel, Barcelona, Spain) siguiendo el Esquema A2: (1) secuencial utilizando diferentes

disolventes en orden creciente de polaridad: acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua; (2) secuencial utilizando acetato de etilo y agua y (3) directamente con agua. Para ello, muestras de 100 g de alpeorujo seco y extractado recogidas en cartuchos de papel de celulosa se extrajeron con 400 ml de los diferentes solventes durante 8 h salvo para la obtención del extracto acuoso que se realizó durante 16 h. Transcurrido el tiempo de extracción, los extractos líquidos se evaporaron en rotavapor hasta su sequedad resuspendiendo el sólido obtenido en agua destilada en el volumen de partida. Las muestras de alpeorujo sólido obtenido tras la extracción se secaron durante 24 h bajo la campana de extracción y se guardaron a -4 °C hasta su posterior utilización.

Esquema A2. Esquema del proceso de extracción del alpeorujo seco y extractado con soxhlet.



1.2.3. Extracción líquido-líquido de acetato de etilo a partir de extracto acuoso

A partir del extracto acuoso obtenido mediante extractor orbital tal y como se describe en el apartado 1.2.1. se realizó una extracción líquido-líquido en decantador con acetato de etilo en proporción 1:1 (v:v) obteniéndose una fase de acetato de etilo y

otra de agua. Este proceso se repitió tres veces y cada uno de los extractos de acetato de etilo se filtró a través de un algodón cubierto con SO_4Na_2 anhidro para eliminar el posible contenido en agua y posteriormente se evaporaron en rotavapor hasta sequedad. El sólido evaporado se resuspendió en agua tal y como se procedió en todos los anteriores extractos orgánicos y se almacenó hasta su posterior utilización.

2. Hongos saprobios

2.1. Tipos y características de los hongos saprobios utilizados

Para realizar los ensayos se usaron dos tipos de hongos saprobios en función de su hábitat natural, hongos saprobios del suelo y hongos saprobios de la madera. Se utilizaron los hongos saprobios del suelo *Fusarium lateritium*, *F. oxysporum* 738, *F. graminearum*, *Mucor racemosus*, *Penicillium chrysogenum*-10, *P. chrysogenum*. Los hongos saprobios de la madera fueron: *Pleurotus pulmonarius*, *Pl. eryngii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriopsis rigida*, *Trametes versicolor*, *T. trogii*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phlebia radiata* y *Fomes sclerodermeus*.

Especie/cepa	Procedencia	Referencia
<i>F. lateritium</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Nees, 1817, BAFC Cult n° 2317
<i>F. oxysporum</i> 738	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schltldl, 1824, BAFC Cult n° 738
<i>F. graminearum</i>	Aislado de suelo de Buenos Aires	Schwabe, 1839, BAFC Cult n° 122
<i>M. racemosus</i>	Aislado de alpeorujó	Bull 1791, EEZ 2
<i>P. chrysogenum</i> 10	Aislado de suelo de Castañar de Ibores	Thom, 1910, EEZ 10
<i>P. chrysogenum</i>	Aislado de suelo de Granada	Thom, 1910, EEZ 1
<i>Pl. pulmonarius</i>	Aislado de madera de latifoliadas	(Fr.) Quéll., 1872, CBS 507.85
<i>Pl. eryngii</i>	Carpóforo comercial	(DC.) Gillet, 1874, CBS 613.91
<i>Ph. chrysosporium</i>	Aislado de madera de pino	Burdsall, 1974, ATCC n° 24725
<i>C. rigida</i>	Aislado de madera de haya	Berk. & Mont. Murill, 1908, CECT 20449
<i>T. versicolor</i>	Aislado de madera de haya	(L.) Lloyd, 1921, A 136
<i>T. trogii</i>	Aislado de madera de sauce	Berk, 1850, 463-B
<i>Py. cinnabarinus</i>	Aislado de madera de haya	(Jacq.) Fr. 1881, CECT 20448
<i>Phl. radiata</i>	Aislado de madera de roble	Fr, 1821, CBS 184.83
<i>Fo. sclerodermeus</i>	Aislado de madera de álamo	(Lév.) Cooke, 1885, 2756

2.2. Aislamiento de hongos saprobios del suelo

Los hongos saprobios del suelo se aislaron a partir de muestras de suelos rizosféricos de distintos cultivos de Granada, Cáceres y Buenos Aires (Argentina). El aislamiento de dichos hongos se realizó según el método descrito por Widden y Bisset (1972) que consiste en lavados del suelo a través de varios tubos de metacrilato divididos en 3 secciones mediante filtros sucesivos de malla metálica y luz decreciente de superior a inferior.

Una vez colocadas las muestras en la parte superior de cada tubo estos se llenaron con agua estéril, y se hizo burbujear el agua con las muestras por medio de introducción de aire durante 3 min. A continuación, los tubos se vaciaron y se llenaron de nuevo con agua estéril, repitiendo la misma operación hasta 5 veces, cantidad necesaria para eliminar completamente la población 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 a placas de Petri con medio de cultivo extracto de malta (MEA) y antibióticos (estreptomomicina:tetraciclina; 0,5%:0,25%). Las placas se incubaron a 28 °C durante varios días y los hongos que crecieron se repicaron en tubos de ensayo con medio agar patata (PDA) en pico de flauta y se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

2.3. Aislamiento de hongos saprobios de la madera

Los hongos saprobios de la madera se aislaron de troncos de madera en descomposición a partir del micelio y de los cuerpos fructíferos (solo para los basidiomicetos). El micelio recogido se colocó en placas de Petri que contenía medio de cultivo MEA con antibiótico y se incubaron en estufa a 28 °C. Se obtuvo un cultivo puro resembrando una porción de éste en una nueva placa.

3. Hongos arbusculares

El hongo micorrícico elegido para los ensayos fue *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss and Menge) procedente del Instituto de Agrobiológicas de Galicia (CSIC). El

inóculo utilizado estaba formado por suelo, esporas (25-35 esporas/g), micelio y fragmentos de raíces colonizadas con los endófitos (60-70% de longitud de raíces infectadas).

La inoculación se realizó añadiendo 8 g de inóculo-suelo por maceta y mezclándolo homogéneamente con el sustrato. En los tratamientos control sin micorriza se añadió un filtrado de suelo para restituir el componente biológico libre de propágulos formadores de micorrizas VA.

4. Medios de cultivo

4.1. Medio de cultivo para hongos saprobios

Los hongos saprobios se cultivaron en placas de Petri con medio MEA esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 min. A dicho medio se le añadieron los antibióticos, estreptomycin (5µg/l) y tetraciclina (2,5 µg/l) previamente esterilizados por filtración con filtros Millipore de 0,2 µm de tamaño de poro. Los hongos saprobios sembrados en placas de Petri con dichos medios se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 1 semana aproximadamente dependiendo de la especie de hongo.

Medio MEA	
Composición	Concentración g/l
Extracto de Malta	2
Peptona	2
Glucosa	20
Agar	15
pH	4,7

5. Incubación del alpeorujo y sus extractos sólidos y líquidos con hongos saprobios

5.1. Incubación del alpeorujo y sus extractos sólidos con hongos saprobios

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

Se incubaron estáticamente 80 g de alpeorujo o de los extractos sólidos estériles en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad durante 2, 4 o 20 semanas según el experimento a 28 °C. Cada matraz se inoculó con 6 granos de cebada incubada con los distintos hongos utilizados en nuestro estudio. Como controles se utilizaron matraces con alpeorujo a los que se añadió granos de cebada sin inocular.

Tras el periodo de incubación, las muestras destinadas a ensayos de fitotoxicidad se autoclavaron a 120 °C durante 20 min y se guardaron a 4 °C y las muestras destinadas a estudios bioquímicos se almacenaron a -80 °C.

5.2. Incubación de los extractos líquidos de alpeorujo con hongos saprobios

Los hongos saprobios se cultivaron inicialmente en extracto acuoso de alpeorujo con objeto de activar la maquinaria enzimática degradativa de compuestos fenólicos. Estos se cultivaron en matraces de 250 ml con 70 ml de extracto acuoso de alpeorujo, realizado tal y como se ha descrito anteriormente, diluido a la mitad para evitar que las condiciones de toxicidad fueran limitantes para su crecimiento y con los nutrientes del medio Czapek a excepción de la fuente de carbono. Tras la esterilización a 120 °C durante 20 min cada matraz se inoculó con 2 cuadrados 0.5x0.5 cm de medio con los hongos, y se dejaron crecer durante 15 días en agitación en una cámara de cultivo a 28 °C. Transcurrido este tiempo el micelio fúngico generado se filtró con un colador estéril y se homogeneizó. Una cucharada de este homogeneizado fue el inóculo utilizado para

la incubación de los extractos de alpeorujos objeto de estudio con los hongos saprobios seleccionados.

Medio CZAPEK	
Composición	Concentración (g/l)
NO ₃ Na	2
ClK	0,59
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,59
SO ₄ Fe.7H ₂ O	0,01
PO ₄ H ₂ K	1
Sacarosa	30
pH	5

Los extractos obtenidos del alpeorujos después del fraccionamiento físico se incubaron en matraces de 250 ml con 70 ml de cada uno de los extractos. Cada matraz se inoculó con una cucharada del homogeneizado de micelio de los distintos hongos saprobios objeto de estudio. Al igual que los inóculos, los cultivos se mantuvieron en agitación durante 15 días en una cámara de cultivo a 28 °C.

Transcurrido el período de incubación, los extractos de alpeorujos se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 min y se filtraron con filtros estériles para recoger el micelio. El sobrenadante se almacenó a -80 °C para los distintos ensayos bioquímicos y de toxicidad. El micelio del hongo se lavó y tras su secado a 100 °C se determinó el peso seco.

6. Ensayos con plantas

6.1. Suelo empleado

Como sustrato para el crecimiento de las plantas se utilizó suelo procedente de la finca experimental de la EEZ, CSIC, Granada. Las características analíticas de este suelo son las siguientes:

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

El suelo 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. Este suelo se mezcló con arena de cuarzo en proporción 2:3 (v:v) para los ensayos en maceta y con arena:turba:vermiculita 1:1:1 (v:v) para los semilleros. Estas mezclas se esterilizaron en un tindalizador a vapor fluente 100 °C durante 1 h, repitiendo el proceso durante 3 días consecutivos. De esta forma queda libre de propágulos de micorrizas y otros organismos que puedan interferir en el experimento.

6.2. Plantas

Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L., variedad Muchamiel) y alfalfa (*Medicago sativa* L., variedad Aragón) para la realización de los ensayos.

6.3. Esterilización de semillas

Las semillas se esterilizaron en superficie durante 15 min con una solución al 50% de agua e hipoclorito sódico al 3,5%. Pasado este tiempo se lavaron varias veces con agua estéril para eliminar posibles restos y se les añadió H₂O₂ al 7% durante 15 min. Posteriormente se volvieron a lavar con agua estéril hasta la completa eliminación del

H₂O₂ y se dejaron en imbibición 1 h y media, las semillas de tomate y 30 min las de alfalfa.

6.4. Cultivos hidropónicos

Estos ensayos se realizaron en tubos de cristal de 20x200 mm, con 15 ml de solución nutritiva Hewitt (Hewitt, 1966). Los diferentes extractos líquidos de alpeorajo obtenidos tal y como se describe anteriormente se añadieron al medio de cultivo a una proporción final de 0, 2,5, 5, 10 y 15% del volumen final. En cada tubo se introdujo un trozo de papel Whatman nº1 como modo de soporte para la semilla. Los tubos se autoclavaron a 120 °C durante 20 min.

Las semillas de tomate esterilizadas y germinadas tal y como se indica anteriormente se colocaron en los tubos y se dejaron crecer en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. A los 15 días de crecimiento se recogieron las plantas determinándose el peso húmedo y seco tras secarlas a 70 °C durante 48 h.

6.5. Cultivos en maceta

Transcurrido el tiempo de imbibición tras la esterilización, las semillas se colocaron en placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua estéril y se mantuvieron en una estufa a 28 °C hasta su germinación. Las semillas germinadas se transfirieron a semilleros que contenían como sustrato una mezcla de suelo:arena:turba:vermiculita 1:1:1:1 (v:v). Tras su crecimiento las plántulas se transplantaron a macetas seleccionadas en base a la homogeneidad de tamaño.

Las plantas se cultivaron en macetas, con una capacidad de 300 ml, bajo condiciones controladas en una cámara de cultivo con un 70%-80% de humedad relativa, temperaturas día/noche de 25/15 °C, un fotoperiodo de 16 h y una intensidad luminosa de 460 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se regaron por capilaridad y recibieron durante todo su crecimiento un aporte semanal de 10 ml de solución nutritiva Hewitt (Hewitt, 1966). La composición de esta solución varió en función del tratamiento, así para los tratamientos con micorrizas la cantidad de fósforo añadido fue menor (0,5 g/l) que para los controles no inoculados. La composición de la solución nutritiva es la siguiente:

Solución nutritiva HEWITT		
Composición	Concentración (g/l)	ml/l solución
KNO ₃	30,3	10
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	70,8	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	18,14	20
Fe (II)-EDTA	2,5	10
MnSO ₄ · 7H 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
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,35	0,1
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	20,8	10
Agua		hasta 1000ml
pH		7

6.6. Ensayos de campo

Los experimentos de campo se llevaron a cabo en la finca experimental de la EEZ (CSIC, Granada). Para ello se delimitaron parcelas de 30x40 cm a las que se añadió el alpeorujillo tratado o sin tratar y se mezcló con el suelo. Las plantas de tomate obtenidas tras esterilizar y germinar las semillas tal y como se describe anteriormente se transplantaron a macetas de 100 ml de volumen que contenían como sustrato suelo:arena:vermiculita 1:1:1. Tras un mes de crecimiento en el invernadero se seleccionaron las plantas en base a su homogeneidad de tamaño y se transplantaron a las parcelas. Se regaron en función de las necesidades hídricas y se cosecharon a las 2, 6 y 10 semanas de crecimiento.

6.7. Determinaciones realizadas en ensayos con plantas

En el momento de la cosecha, el sistema radical se separó del suelo lavándolo con agua corriente. Se determinó el peso seco de la parte aérea y raíz tras secarlas a 70 °C durante 48 h. Previamente, las raíces se dividieron en dos 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 otra alícuota se tiñó siguiendo la

técnica clásica basada en el uso de fuscina para cuantificar las estructuras fúngicas que colonizan la raíz.

7. Cuantificación de la micorrización en raíces

7.1. Tinción de raíces

Una vez obtenidas en el momento de la cosecha, las raíces se tiñeron siguiendo el método de Phillips y Hayman (1970). Una vez lavadas y troceadas las raíces se sumergieron en KOH al 10% y se mantuvieron 15 min a 100 °C al baño maría. Este tratamiento permite la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz. A continuación se lavaron con abundante agua corriente para eliminar los restos de KOH en la raíz. Después se trataron con ClH 0,1N durante 3 min a temperatura ambiente con el objeto de neutralizar y preparar las raíces para la entrada del colorante. Las raíces se tiñeron con una solución de fuscina al 0,05% en ácido láctico durante 10 min a 100 °C. Una vez teñidas se eliminó el exceso de colorante y se conservaron en una solución de ácido láctico hasta su posterior observación a la lupa binocular. El colorante fuscina tiñe las estructuras que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de algunos hongos, entre ellos los formadores de micorrizas arbusculares (Bartnicki-García, 1968), así se observan los componentes del hongo en el interior de la raíz sin que ésta se colorea.

7.2. Cuantificación de la micorrización

El grado de colonización micorrícica se midió usando el método de Giovannetti y Mosse (1980). Para ello los fragmentos de raíces teñidas se extienden al azar en una placa de 10 cm de lado dividida en cuadrículas de 1,3 cm y se observa en la lupa binocular el número de intersecciones de las raíces con la cuadrícula que presentan micorrización y de las que en el punto de cruce no la presentan. El porcentaje de micorrización se define como el porcentaje de intersecciones que muestran infección con respecto al total de intersecciones.

8. Ensayos de fitotoxicidad en *Lepidium sativum*

El ensayo de fitotoxicidad se realizó, aunque con modificaciones, según el método de Zucconi *et al.* (1981) que consiste en la medición del índice de germinabilidad de semillas de berro de jardín (*Lepidium sativum* L.). Los ensayos se realizaron en placas Petri de 9 cm de diámetro con un disco de papel Whatman nº1 a las que se añadió 2 ml tanto de agua destilada, usada como control, como de los diferentes extractos de alpeorujos a las distintas concentraciones. Finalmente se distribuyeron 20 semillas de berro por placa previamente imbibidas en agua corriente durante 1 h y se dejaron incubar a 28 °C en oscuridad durante 48 h. Transcurrido este tiempo se detuvo la germinación añadiendo 1 ml de etanol por placa.

Los ensayos de germinabilidad del sólido se realizaron de forma similar, aunque usando la vermiculita como soporte. A las placas de Petri se les añadió una cantidad total de 10 g de vermiculita por placa mezclada con alpeorujos en distintas concentraciones. Posteriormente se dispuso un disco de papel Whatman nº1 sobre la mezcla y se añadió 10 ml de agua destilada estéril hasta alcanzar la capacidad de campo. Las semillas de berro (20) previamente imbibidas en agua corriente durante una hora se dispusieron en las placas y se dejaron incubar 72 h a 28 °C en oscuridad.

En ambos casos se contabilizó el número de semillas germinadas por placa y se determinó la longitud de la radícula de las mismas mediante un escalímetro. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

El porcentaje del índice de germinación (IG) se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IG = \left(\frac{G}{G_0} \times \frac{L}{L_0} \right) \times 100$$

donde:

G y G₀ = nº semillas germinadas en el extracto y el control

L y L₀ = es la medida de la longitud radicular en el extracto y en el control.

9. Ensayos de decoloración de alpeorujos

Debido a que las condiciones de cultivo influyen profundamente sobre las condiciones fisiológicas degradativas de los hongos, se utilizaron varios medios de cultivo para determinar la disminución de color en los extractos de alpeorujos incubados con hongos saprobios. Se prepararon medios a los que se añadieron agar o MEA con concentraciones de 5, 25 y 50% de extracto acuoso de alpeorujos. Los hongos saprobios se inocularon en las placas Petri con los distintos medios de cultivo y se incubaron a 28 °C durante 60 días. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento. Posteriormente se midió el porcentaje de decoloración de los extractos de alpeorujos tras el crecimiento de los hongos saprobios mediante la medida de densidad óptica del medio por el programa "Quantity One". Los resultados se expresaron como la diferencia de densidad óptica del medio control y en el que creció el hongo.

10. Técnicas bioquímicas y determinaciones enzimáticas

10.1. Obtención de los extractos enzimáticos de alpeorujos

Para la determinación de las actividades enzimáticas: endopolimetilgalacturonasa, endoglucanasa, endoxiloglucanasa y manganeso peroxidasa, así como para la determinación de azúcares totales presentes en el alpeorujos se realizó la extracción de este siguiendo el procedimiento descrito por Rejón-Palomares *et al.* (1996).

Las muestras de alpeorujos secos y extractados se molieron en un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino. A continuación se añadió polivinil polipirrolidona (PVPP) en proporción 0,15 g/g de alpeorujos, para evitar la inhibición de la actividad enzimática por fenoles y 0,15 mM de fenilmetilsulfonil fluor (PMSF), para inhibir las proteasas. La mezcla resultante se homogeneizó en el tampón de extracción B en proporción 1:3 (peso alpeorujos:volumen). La mezcla obtenida se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 15.700 xg durante 20 min a 4 °C. El extracto obtenido se conservó a -20 °C hasta su posterior utilización.

Tampón de extracción B	
Composición	Concentración
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)
pH	7

10.2. Sustratos utilizados

Como sustratos enzimáticos se emplearon pectina cítrica, carboximetilcelulosa y xiloglucano respectivamente para la determinación de las actividades endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG; EC 3.2.1.15), endoglucanasa (endo-GN; EC 3.2.1.4) y endoxiloglucanasa (endo-XG). Estos sustratos se disolvieron en tampón cítrico fosfato 50 mM a pH 5 en proporciones 0,5% para las actividades endoglucanasa y endoxiloglucanasa y 1% para la actividad endopolimetilgalacturonasa. Todas las disoluciones se conservaron a 4 °C durante periodos de tiempo nunca superior a 4 semanas.

Obtención de xiloglucano

La obtención del xiloglucano se realizó a partir de 100 semillas de capuchina (*Tropaeolum majus* L.) rehidratadas durante 18 horas y homogeneizadas con una “Sorval omnimixer” con 25 ml de agua destilada. Al homogeneizado resultante se le añadieron 450 ml de una solución NaOH 2 M y NaBH₄ 0,05% y se mantuvo al baño maría durante 1 h con agitación cada 15 min. Esta mezcla 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 Fheling [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 homogeneizado se le añadieron 100 ml de la

solución A de Fheling's (CuSO_4 0,47 M) y se centrifugó a 2.000 $\times g$ durante 10 min. El precipitado se disolvió en 300 ml de ácido acético:agua 1:4 (v:v) y el xiloglucano no acomplexado 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 homogeneizado obtenido se volvió a centrifugar a 2.000 $\times g$ 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 utilización.

10.3. Determinación cuantitativa de las actividades enzimáticas

10.3.1. Determinación de la actividad endohidrolítica

Para la determinación de las actividades enzimáticas endohidrolíticas se utilizó el método de viscosimetría de Rejón-Palomares *et al.* (1996), basado en la valoración de la pérdida de viscosidad de la mezcla de la reacción como consecuencia de la acción hidrolítica del enzima en las partes internas de las cadenas, que causan una despolimerización y por lo tanto una pérdida de viscosidad.

La reacción se llevó a cabo a 37 °C en un volumen de reacción de 1 ml de los diferentes sustratos para cada una de las distintas actividades y 200 μl de muestra. La reacción se inició contabilizando la pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 0 y transcurridos 30 min. La viscosidad se midió en una jeringa de 1 ml y se contabilizó el tiempo que tardaba en bajar 500 μl de la mezcla de la reacción. La actividad enzimática se calculó en base al porcentaje de disminución de la viscosidad de la disolución del sustrato respecto al tiempo. Esta actividad se expresó en unidades internacionales, definida como la actividad relativa (A.R.)/g de alpeorajo 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 .

$$\text{A.R} = \frac{1}{T_{50}} \cdot 1000 \quad T_{50} = \frac{50 \cdot T_x}{\%X} \quad \%X = \frac{T_0 - T_x}{T_0} \cdot 100$$

Donde:

%X = pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción a un tiempo x de reacción.

T₀= viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 0.

T_x= viscosidad de la mezcla de reacción a tiempo 30 min.

T₅₀= tiempo necesario para alcanzar un pérdida de viscosidad de la mezcla de reacción del 50% a 30 min.

10.3.2. Determinación de la actividad lacasa

La lacasa (EC 1.10.3.2) es un fenoloxidasasa que reduce el oxígeno molecular a agua, siendo capaz de oxidar distintos compuestos tanto fenólicos como no fenólicos. La actividad lacasa se midió según el método propuesto por Saparrat *et al.* (2000) basado en la oxidación, por parte de la lacasa, de un sustrato, lo que produce un cambio de color. Como sustrato se utilizó el 2,6-dimetoxifenol (DMF).

En el caso de la determinación de lacasa en muestras sólidas, se añadió 1 g de alpeorujo a 10 ml de agua en tubos de ensayo de 15 ml. Los tubos se colocaron en una placa agitadora a temperatura ambiente durante 3 h y posteriormente se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 min y el sobrenadante obtenido se dializó frente a agua destilada en membranas de celulosa de 6000 – 8000 Daltons de tamaño de poro durante 24 h a 4 °C. Para la determinación de lacasa de extractos de alpeorujo estas se dializaron de igual forma que los sobrenadantes obtenidos de la extracción descrita anteriormente.

La actividad lacasa se valoró directamente en la cubeta del espectrofotómetro a 469 nm determinando la cinética de la reacción enzima-sustrato a temperatura ambiente. Los reactivos utilizados por orden de aplicación fueron:

Actividad lacasa		
Composición	Concentración	µl
Tampón acetato sódico pH 5	200 mM	500
Muestra		100
Agua destilada		300
Dimetoxifenol DMF	50 mM	100

La actividad lacasa se expresó en unidades internacionales (UI) por g de alpeorujó teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del DMF $\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

10.3.3. Determinación de la actividad manganeso peroxidasa

La actividad manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) se determinó según el método de Périé y Gold (1991) modificado. La MnP es una enzima que cataliza la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} dependiente de H_2O_2 oxidando a una amplia variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos. Para la determinación de la actividad la mezcla de la reacción contenía:

Actividad manganeso peroxidasa		
Composición	Concentración	μl
Tartrato 200 mM, pH 5	100 mM	500
Mn^{2+} 10 mM	5 mM	10
DMF 50 mM	100 μM	100
Muestra		100
Agua		280
H_2O_2 10 mM ^a	100 μM	10

^a Preparada diariamente y añadida en último lugar a la mezcla de reacción.

La reacción se realizó durante 15 min a temperatura ambiente midiéndose transcurrido este tiempo la absorbancia en el espectrofotómetro a 469 nm. La actividad MnP se expresó en unidades internacionales (UI) por g de alpeorujó considerando el coeficiente de extinción molar del DMF $\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

10.4. Determinaciones analíticas

10.4.1. Determinación de azúcares totales

El contenido en azúcares totales se determinó según el método de antrona descrito por Whithan *et al.*, (1971) que se basa en la cuantificación de hexosas, aldopentosas y

ácidos hexourónicos que se encuentren, bien libres o formando parte de un polisacárido. El medio ácido en el que se realiza la reacción, hidroliza los enlaces glucosídicos y los monosacáridos resultantes reaccionan con la antrona produciendo un color verde azulado que se mide a 625 nm en el espectrofotómetro.

La reacción se llevó a cabo en tubos de cristal sumergidos en hielo a los cuales se les había añadido previamente 5 ml de reactivo de antrona. A continuación y sobre dicho reactivo se le añadió 1 ml de extracto de alpeorujo con sus respectivas diluciones, deslizando la muestra por la pared para evitar la mezcla. Tras agitar vigorosamente los tubos se hierven 10 min a 100 °C. Pasado este tiempo se detuvo la reacción en un baño con hielo y finalmente se midió su absorbancia en el espectrofotómetro usando como curva patrón glucosa a unas concentraciones de 20 a 160 µg/ml y como blanco agua destilada.

El contenido de azúcares se expresó como mg de azúcares por g de alpeorujo.

- Reactivo de Antrona: a 20 ml de agua destilada se añaden poco a poco 100 ml de ácido sulfúrico concentrado. En el momento de usar se disuelven 0,2 g de antrona en 100 ml de esta mezcla.

10.4.2. Determinación de polifenoles totales extractables

El contenido de fenoles del alpeorujo seco y extractado se realizó mediante una determinación colorimétrica por el método de Ribereau-Gayon (1968) basado en la reducción en medio alcalino de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfowolfrámico (reactivo de 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 nm a 750 nm. La medida de la absorción a 725 nm es proporcional a la concentración del compuesto.

Para la determinación de polifenoles se tomaron alícuotas de 0,2 g de alpeorujo a las que se le añadió 10 ml de una mezcla de acetona:agua (1:1) con ácido fórmico al 0.5%. Los tubos con la mezcla se mantuvieron en hielo y se sonicaron en un baño de ultrasonido durante 10 min. A continuación se mantuvieron en agitación a 4 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se volvió a sonicar durante 10 min y finalmente se centrifugó a 1100 xg durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de fenoles.

La determinación de fenoles del alpeorujó y de los distintos extractos de éste se llevó a cabo en tubos con 880 µl de agua a los que se le añadieron 120 µl del extracto de alpeorujó o de la solución de ácido tánico utilizada como curva patrón (0 a 100 µg/ml). La reacción se inició añadiendo 500 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2,5 ml de Na₂CO₃ al 20% (p:v). Tras 35 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia de la mezcla de reacción en el espectrofotómetro a 725 nm. Los datos obtenidos se expresaron en g de fenoles por kg de alpeorujó.

11. Cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron placas de aluminio de cromatografía en capa fina de MERCK de Sílica gel 60 F₂₅₄ (20x20 cm). Se aplicaron mediante un capilar, 10 µl de los diferentes extractos de alpeorujó obtenidos tras evaporarlos en rotavapor y resuspenderlos en metanol. Una vez secas las muestras aplicadas a las placas, se introdujeron en la cubeta que contenía 25 ml de los solventes. Para la elución y separación de los componentes fenólicos se utilizaron acetona:n-hexano 4:6 (v:v). Tras la elución de los compuestos fenólicos la visualización se realizó con luz ultravioleta a 254 nm. El revelado de las placas se llevó a cabo pulverizando una solución acuosa al 1% de FeCl para la visualización de los componentes fenólicos. Una vez pulverizados los cromatogramas se introdujeron en una estufa a 100 °C durante 5 min.

12. Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa acoplada a la detección por espectrometría de masas

Los distintos extractos de alpeorujó se liofilizaron, se resuspendieron en metanol y se centrifugaron a 2.300 xg durante 10 min. Finalmente los extractos se filtraron con un filtro de 0,45 µm se inyectaron en el sistema cromatográfico para su posterior análisis.

Se utilizó un cromatógrafo líquido SURVEYOR MS micro HPLC, (Thermo Finnigan, San José, CA, USA) con una columna una Hypersil BDS C18 de 25 cm de largo y 4,6 mm de ancho y un tamaño de partícula de 5µm (Thermo, Bellefonte, PA, USA). La separación se realizó bajo gradiente de elución donde las fases móviles estaban constituidas por agua acidificada con ácido acético 0,05% (A) y metanol (B). Después de 2 min al 5% del solvente B la elución transcurrió según las siguientes

condiciones: del 5% de B al 10% de B en 3 min; 20% de B en 13 min; 30% B en 25 min; 50% B en 10 min y 95% de B en 17 min, manteniéndose esta mezcla constante durante 5 min más. El flujo de elución de la fase móvil fue de 1 ml/min y se inyectó 20 μ l de muestra.

Un 20% del eluyente se analizó con un detector UV Surveyor PDA (Thermo Finnigan, San José CA, USA) monitoreando la reacción a 280 nm y 320 nm. El 80% del eluyente restante se analizó por ESI/MS en modo negativo usando un instrumento Finnigan LCQ DECA XP Plus ion trap controlado por el programa Xcalibur. Para el análisis de las muestras se utilizaron las siguientes condiciones: flujo de muestra inyectada en el ionizador de 3 μ l/min, voltaje capilar de 10V, voltaje del spray a 3 kV, voltaje del tubo de la lente de compensación 10V y temperatura del capilar a 270 °C. Los datos se obtuvieron en modo MS1 y MS/MS.

13. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos de los distintos experimentos realizados se sometieron a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas. Tras éste análisis, ante la ausencia de diferencias significativas se efectuó un análisis de varianza (ANOVA). Los datos expresados en porcentaje se transformaron en el arco seno de su raíz cuadrada. Las barras de error en las gráficas representan la desviación estándar y las letras representan valores estadísticamente distintos mediante el test de Tukey o Duncan's para comparaciones múltiples ($p \leq 0,05$).

Resultados y discusión



Capítulo I

Fraccionamiento físico del alpeorujo y determinación de su fitotoxicidad

I. Fraccionamiento físico del alpeorujó y determinación de su fitotoxicidad

1.1. Fitotoxicidad del alpeorujó

Objetivo

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el alpeorujó resulta fitotóxico para las plantas cultivadas en invernadero, sin embargo, no se conoce si el efecto de dicho residuo se mantiene en plantas cultivadas en condiciones no controladas (Martín *et al.*, 2002, Sampedro *et al.*, 2004b). Por ello se va a investigar los efectos fitotóxicos del alpeorujó sobre el crecimiento de plantas bajo condiciones de campo.

1.1.1. Análisis de la fitotoxicidad del alpeorujó sobre plantas cultivadas en macetas

Materiales y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con un factor de variación, que fue la aplicación de alpeorujó a diferentes dosis (0, 2,5, 5 y 10%). Los experimentos se realizaron en plantas de tomate con cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Se emplearon semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero. Cuando las semillas alcanzaron un tamaño adecuado se transfirieron a macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo:arena (1:1) esterilizado. El alpeorujó se aplicó a las macetas en proporciones de 2,5, 5 y 10% salvo al control, al que no se le añadió alpeorujó. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de invernadero durante 5 semanas. Semanalmente se fertilizaron con 10 ml de solución nutritiva Hewitt.

Una vez cosechadas se determinó el peso seco de la parte aérea en plantas de tomate después de secarlas en estufa durante 48 h a 70 °C.

Resultados

El alpeorujó presenta marcados efectos fitotóxicos en plantas cultivadas en condiciones de invernadero tal y como se observa en la Fig. 1 ya que la aplicación de la dosis menor de alpeorujó (2,5%) redujo más de la mitad del peso seco de las plantas de tomate. Este efecto fitotóxico aumentó conforme se incrementaba la dosis de alpeorujó llegando a reducir el 97% del peso seco de las plantas de tomate en los tratamientos donde se administró una dosis alta de alpeorujó (10%).

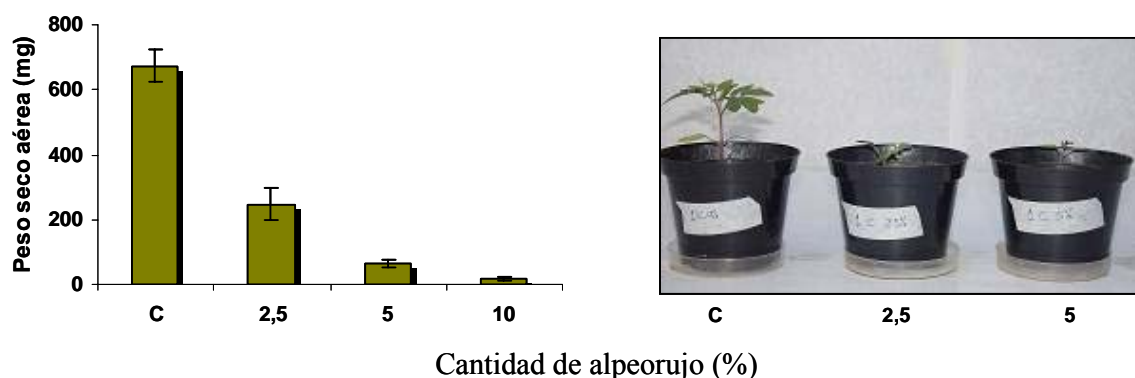


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en condiciones de invernadero sin alpeorujó (C) y en presencia de varias concentraciones de alpeorujó (2,5, 5 y 10%). Las barras en cada columna indican el error estándar.

1.1.2. Análisis de fitotoxicidad del alpeorujó sobre plantas cultivadas en parcelas de campo

Materiales y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó con un factor de variación, que fue el tiempo de crecimiento de plantas de tomate cultivadas en parcelas de campo a las que se añadió alpeorujó.

Sistema de cultivo

Se emplearon semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero. Cuando las semillas alcanzaron un tamaño adecuado se transfirieron a macetas de 100 ml de capacidad que contenían como sustrato una mezcla suelo:arena:vermiculita (1:1:1). Tras un mes de crecimiento en el invernadero, las plantas se seleccionaron en base a su homogeneidad de tamaño y se transplantaron a parcelas de la finca experimental de la EEZ de 30x40 cm que contenían el alpeorujito mezclado con el suelo a una concentración del 5% salvo a las parcelas control, a las que no se les añadió alpeorujito. En cada una de las parcelas se aplicó un tratamiento realizando 3 repeticiones por tratamiento y se sembraron 4 plantas de tomate. Las plantas se cultivaron en condiciones de campo durante 2 y 6 semanas. Las plantas se regaron en función de sus necesidades hídricas. Una vez cosechadas las plantas se determinó el peso seco de la parte aérea tras su secado en estufa durante 48 h a 70 °C.

Resultados

El alpeorujito mostró marcados efectos fitotóxicos en plantas de tomate cultivadas en condiciones de campo tal y como podemos observar en la Fig. 2 ya que redujo el peso seco de la parte aérea un 70% a las 2 semanas de crecimiento y el 85% a las 6 semanas.

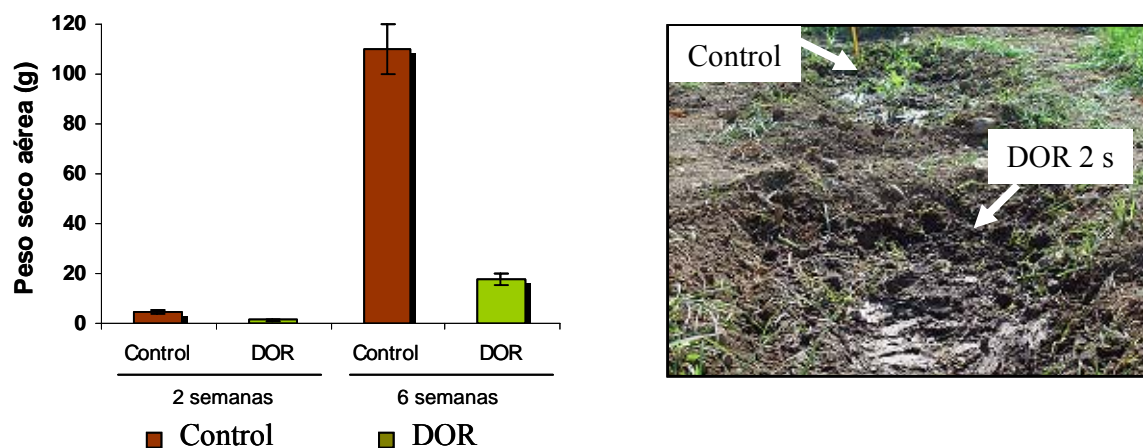


Fig. 2. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas durante 2 y 6 semanas en condiciones de campo sin alpeorujito (Control) y en presencia de alpeorujito (DOR). Las barras en cada columna indican el error estándar.

1.2. Fitotoxicidad de las fracciones físicas del alpeorujó

1.2.1. Fitotoxicidad del alpeorujó extractado mediante extracción orbital

Objetivo

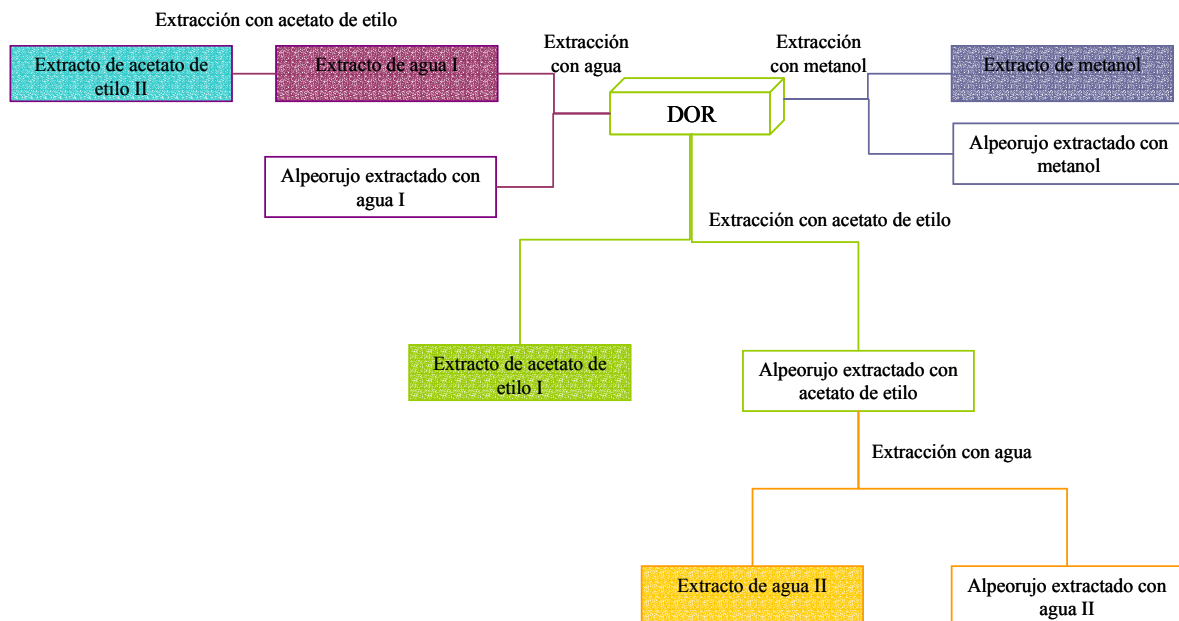
Se ha puesto de manifiesto que los efectos fitotóxicos del alpeorujó sobre las plantas se atribuyen fundamentalmente a la presencia de compuestos fenólicos monoméricos o poliméricos, sin embargo, se desconoce como intervienen cada uno de los constituyentes del alpeorujó en la toxicidad. En este apartado se pretende fraccionar el alpeorujó por medio de extracciones orbitales con diferentes solventes y estudiar cada una de las fracciones sólidas y líquidas de forma independiente para tratar de determinar la naturaleza de las sustancias causantes de la fitotoxicidad del alpeorujó.

Materiales y métodos

Se realizaron extracciones sólido-líquido de alpeorujó mediante un extractor rotativo orbital con diferentes solventes tal y como se describe en el Esquema 1. El alpeorujó se extrajo durante 8 h en proporción 1:2 (p:v) con agua, acetato de etilo y metanol, obteniéndose: **extracto de agua I**, **extracto de acetato de etilo I** y **extracto de metanol** y los correspondientes alpeorujos extractados: **alpeorujó extractado con agua I**, **alpeorujó extractado con acetato de etilo** y **alpeorujó extractado con metanol**. Con el alpeorujó extractado con acetato de etilo se realizó otra extracción con agua obteniéndose el **extracto de agua II** y el **alpeorujó extractado con agua II**. También a partir del extracto de agua I se realizó una extracción líquido-líquido en un decantador de vidrio con acetato de etilo en una proporción 1:1 (v:v), repitiendo la operación 3 veces, tal y como se describe en el capítulo general de materiales y métodos, obteniéndose el **extracto de acetato de etilo II**.

Antes de su uso los cinco extractos obtenidos se secaron en rotavapor y se resuspendieron en agua y los cuatro alpeorujos extractados se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior utilización.

Esquema 1. Esquema del proceso de extracción del alpeorujó seco y extractado con extractor rotativo orbital.



Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos independientes, el experimento A, con la fracción líquida resultante de la extracción orbital del alpeorujó y el experimento B con la fracción sólida resultante tras el proceso de extracción. Ambos experimentos se diseñaron con dos variables. El experimento A, la primera variable fue el tipo de extracto añadido con seis tratamientos: sin extracto de alpeorujó (control) o con extracto de agua I, extracto de acetato de etilo I, extracto de agua II, extracto de metanol y extracto de acetato de etilo II y la segunda variable fue el factor concentración de extracto de alpeorujó con tres tratamientos (5, 10 y 20%). En el experimento B, la primera variable fue el tipo de alpeorujó extractado añadido al suelo con cinco tratamientos: sin alpeorujó (control), con alpeorujó (DOR), alpeorujó extractado con agua I, alpeorujó extractado con acetato de etilo, alpeorujó extractado con agua II y alpeorujó extractado con metanol y la segunda variable fue el factor concentración de este alpeorujó extractado con cuatro tratamientos (2,5, 5 y 10%).

Sistema de cultivo

Ensayo A

El análisis de fitotoxicidad se realizó mediante un ensayo de germinación “in vitro” de semillas de berro (*Lepidium sativum* L). Los diferentes extractos de alpeorujó

obtenidos mediante agitación orbital a concentración de 5, 10 y 20% se añadieron a placas Petri que contenían 20 semillas. Se utilizó como control agua destilada y para cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones. Se contabilizó el número de semillas germinadas y la longitud de la radícula de estas transcurridas 48 h de incubación a 25 °C y los resultados se expresaron como índice de germinación.

Ensayo B

Se realizaron ensayos en macetas, con cuatro repeticiones por tratamiento, empleando semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero. Cuando alcanzaron un tamaño adecuado se transfirieron a macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo:arena (1:1) esterilizado. Los diferentes alpeorujos extractados se añadieron a las macetas en proporciones de 2,5, 5 y 10% salvo al control, al que no se les añadió alpeorujo. Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de invernadero durante 5 semanas. Semanalmente se fertilizaron con 10 ml de solución nutritiva Hewitt.

Las plantas se cosecharon a las 5 semanas y se determinó el peso seco de la parte aérea tras secarlas en estufa durante 48 h a 70 °C.

Resultados

Todos los extractos obtenidos tras la extracción orbital del alpeorujo inhibieron la germinación y crecimiento de semillas de berro (Fig. 3A). El extracto que mostró una menor toxicidad a todas las dosis aplicadas fue el extracto de acetato de etilo, sin embargo el resto de extractos aplicados a dosis bajas (5%) redujeron el índice de germinabilidad a un 70%. Observamos que a medida que aumentamos la concentración de todos los extractos añadidos por placa la reducción del índice de germinabilidad fue mayor. Los extractos acuosos de alpeorujo fueron los más fitotóxicos ya que a concentraciones de 20% inhibieron drásticamente el crecimiento de las semillas de berro.

Los ensayos de fitotoxicidad realizados sobre el crecimiento de plantas en invernadero mostraron que todos los alpeorujos extractados, salvo el realizado con agua (Agua I) aplicado a la dosis de 2,5%, disminuyeron el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (Fig. 3B). Podemos observar que la toxicidad residual de los alpeorujos resultantes de la extracción orbital fue proporcional a la fitotoxicidad de los extractos obtenidos de dicho residuo.

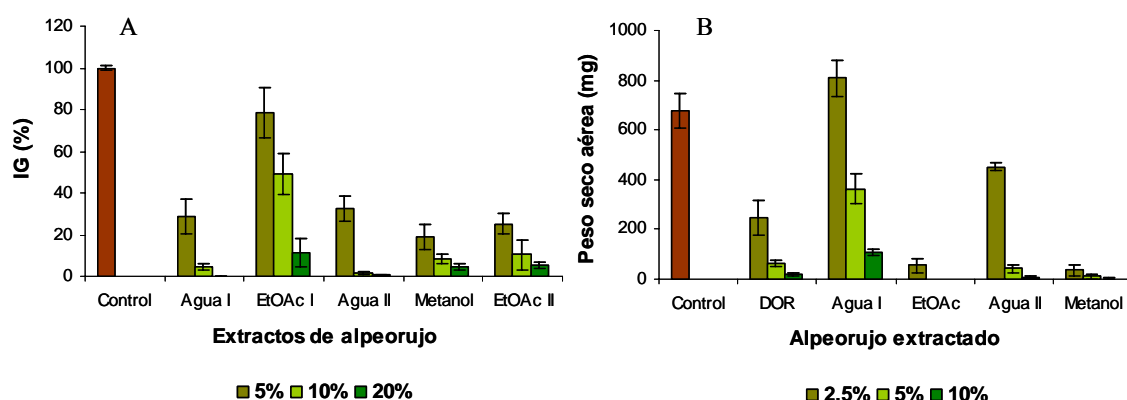


Figura 3. (A) Índice de germinabilidad (%) de semillas de berro (*L. sativum* L.) sin extractos de alpeorujó (Control) o en presencia de varias concentraciones de extractos de alpeorujó realizado mediante extracción orbital con: agua (Agua I y II), acetato de etilo (EtOAc I y II) y metanol. (B) Peso seco de la parte aérea (mg) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas sin alpeorujó (Control) y en presencia de varias concentraciones de alpeorujó (DOR) y alpeorujó extractado mediante extracción orbital con: agua (Agua I y II), acetato de etilo (EtOAc) y metanol. Las barras en cada columna indican el error estándar.

1.2.2. Fitotoxicidad del alpeorujó extractado mediante extracción con soxhlet

Objetivo

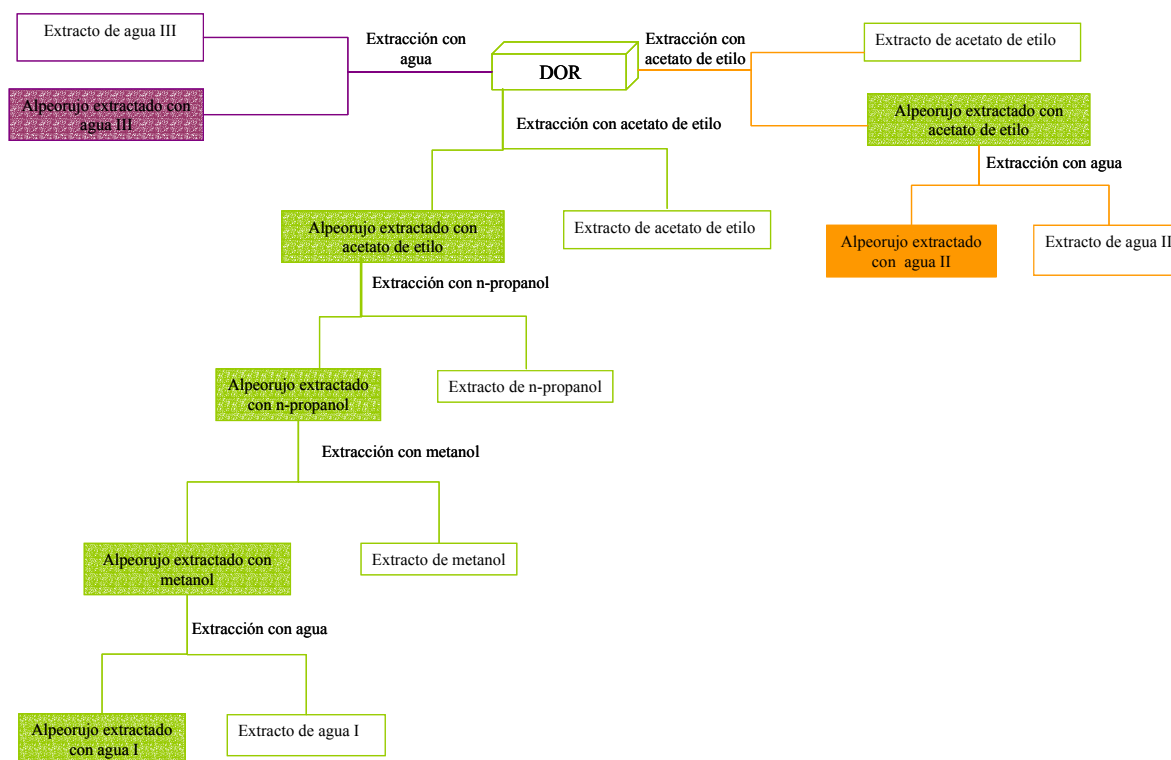
Considerando que mediante extracción orbital no se obtuvo ninguna fracción carente de fitotoxicidad se planteó fraccionar el alpeorujó de forma secuencial con calor en soxhlet con el fin de obtener un residuo libre de fenoles. En las extracciones secuenciales con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua se pueden separar los componentes del alpeorujó en base a su polaridad para determinar los factores determinantes de la fitotoxicidad.

Materiales y métodos

Se realizaron extracciones sólido-liquido en soxhlet con diferentes solventes tal y como se describe en el Esquema 2. Las muestras de alpeorujó se extrajeron

secuencialmente con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua, obteniéndose: **extracto de acetato de etilo**, **extracto de n-propanol**, **extracto de metanol** y **extracto de agua I** y los alpeorujos extractados correspondientes: **alpeorujos extractados con acetato de etilo**, **alpeorujos extractados con n-propanol**, **alpeorujos extractados con metanol** y **alpeorujos extractados con agua I**. Con el alpeorujos extractados con acetato de etilo se realizó otra extracción con agua obteniéndose el **extracto de agua II** y el **alpeorujos extractados con agua II**. Por otro lado y también mediante soxhlet, una muestra de alpeorujos se extrajo directamente con agua obteniéndose el **extracto de agua III** y **alpeorujos extractados con agua III**.

Esquema 2. Esquema del proceso de extracción del alpeorujos seco y extractado con soxhlet.



Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos, el experimento A, con los extractos resultantes de la extracción con soxhlet del alpeorujos y el experimento B con el alpeorujos residual obtenido tras el proceso de extracción. Ambos experimentos se diseñaron con dos variables. En el experimento A la primera variable fue el tipo de residuo aplicado con

seite tratamientos: sin extracto de alpeorujó (control) o con extracto acetato de etilo, extracto n-propanol, extracto metanol y extracto agua I, II y III y la segunda variable fue el factor concentración aplicada con tres tratamientos (10, 20 y 40%). En el experimento B se diseñó de igual forma pero en este caso las variables fueron; la primera los distintos alpeorujos extractados con ocho tratamientos: sin alpeorujó extractado (control), con alpeorujó sin extraer o extraerado con acetato de etilo, n-propanol, metanol, agua I, II y III y la segunda consistió en el factor concentración de estos alpeorujos extraerados con tres tratamientos (3, 3,5, 4%).

Sistema de cultivo

Para la determinación de fitotoxicidad en ambos ensayos se eligió el test de germinabilidad de Zucchini modificado, en semillas de berro de jardín (*L. sativum* L.). En el ensayo A, los extractos de alpeorujó en diferentes concentraciones (10, 20 y 40%) se añadieron a placas Petri que contenían 20 semillas. En el ensayo B, los diferentes alpeorujos extraerados se mezclaron con vermiculita en distintas proporciones (3, 3,5 y 4%). Sobre esta mezcla se dispuso un papel de filtro y tras añadirle 10 ml de agua se colocaron 10 semillas de berro. El tratamiento control se realizó con agua destilada en el ensayo A y vermiculita en el B y en ambos casos por cada tratamiento se establecieron 5 repeticiones. Se contabilizó el número de semillas germinadas y la longitud de la raíz una vez germinadas en estufa durante 48 h (ensayo A) y 72 h (ensayo B) a 28 °C. Los resultados se expresaron en índice de germinación.

Resultados

De todos los extractos de alpeorujó obtenidos mediante soxhlet se observó que los extractos de acetato de etilo, n-propanol y agua III produjeron una reducción elevada del índice de germinabilidad de berro a concentraciones de 40% tal y como se observa en la figura 4A. Sin embargo los extractos obtenidos mediante metanol, agua I y II no redujeron o lo hicieron levemente el porcentaje de germinación de semilla de berro. Cabe destacar que la fitotoxicidad observada en los extractos de alpeorujó se fue reduciendo a medida que se extraeró con los distintos solventes en la extracción secuencial, así el extracto acuoso I fue el extracto que mostró una menor toxicidad a dosis altas.

El alpeorujito sin extraer redujo el índice de germinabilidad de semillas de berro a un 40% a la menor dosis aplicada (Fig. 4B). Tras las distintas extracciones realizadas mediante soxhlet la fitotoxicidad del alpeorujito se redujo en la mayoría de los casos salvo en el extracto agua II. El alpeorujito extraído con metanol, obtenido tras la extracción secuencial con acetato, propanol y metanol, así como el alpeorujito extraído con agua I, obtenido tras la extracción secuencial con acetato, propanol y metanol, no mostraron efectos fitotóxicos algunos sobre la germinación de semillas de berro al aplicarlo a las mayores dosis. En general se observó relación entre los niveles de fitotoxicidad de los extractos de alpeorujito y los del alpeorujito extraído. El alpeorujito extraído con agua II fue el residuo más tóxico mostrando una reducción del índice de germinabilidad mayor que el alpeorujito control.

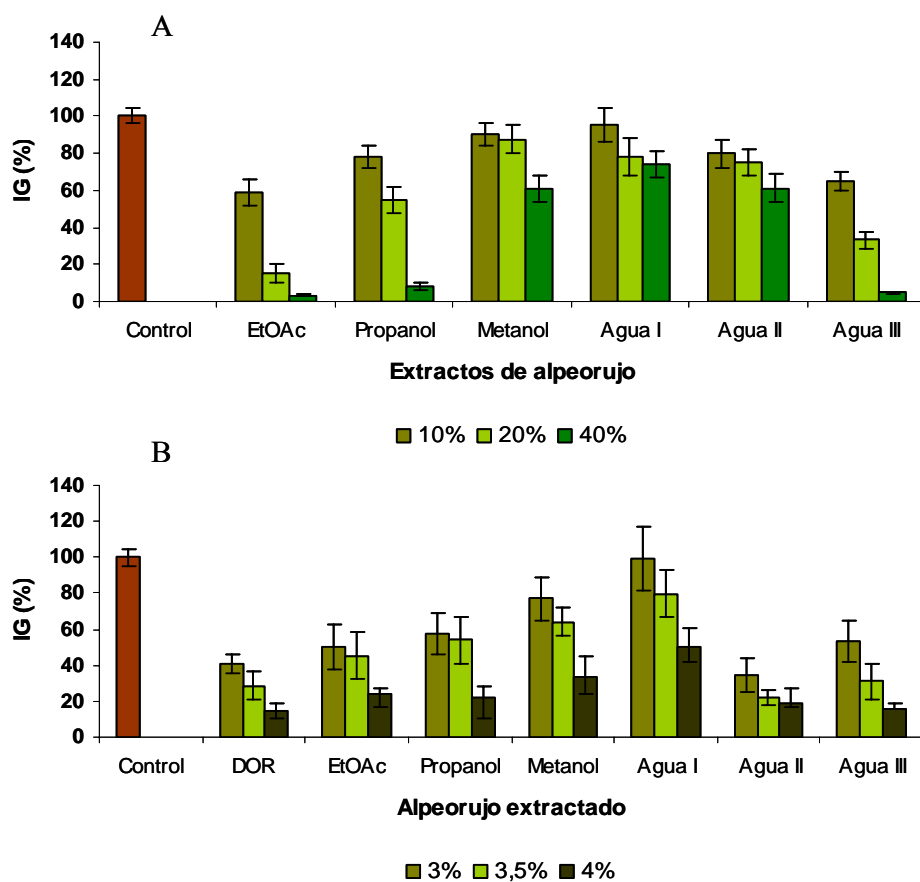


Figura 4. (A). Índice de germinabilidad (%) de semillas de berro (*L. sativum* L.) sin extracto de alpeorujito (Control) y en presencia de distintas concentraciones de los extractos de alpeorujito realizados mediante soxhlet con acetato de etilo (EtOAc), propanol, metanol y agua I, II y III. (B). Índice de germinabilidad (%) de semillas de berro (*L. sativum* L.) cultivadas sin alpeorujito (Control) o en presencia de distintas concentraciones de alpeorujito (DOR) y alpeorujito extraído mediante soxhlet con acetato de etilo (EtOAc), propanol, metanol y agua I, II y III. Las barras en cada columna indican el error estándar de la muestra.

Discusión

El alpeorujo a pesar de contener multitud de componentes con interés agroquímico (materia orgánica, Na, K, P, N) resulta fitotóxico para las plantas de tomate ya que, como puede verse en el ensayo realizado en condiciones de invernadero, la aplicación de un 2,5% de alpeorujo redujo más de la mitad su peso seco. Este efecto fitotóxico se ha observado anteriormente tras la aplicación de alpechín y alpeorujo, ya que estos produjeron la inhibición de la germinación de semillas o la reducción del peso seco de diferentes especies vegetales (Pérez *et al.*, 1986; Martín *et al.*, 2002; El Hadrami *et al.*, 2004).

La fitotoxicidad del alpeorujo fue similar en cuanto a reducción del peso seco de la parte aérea de plantas de tomate tanto en ensayos de invernadero como de campo. A la misma dosis de alpeorujo se observó una fitotoxicidad parecida en ensayos de invernadero y de campo reduciendo el peso seco de la parte aérea un 91 y 85% respectivamente. Este hecho se contradice con los estudios realizados por Fletcher *et al.* (1990) en el que observa que existen resultados diferentes cuando se comparan ensayos en campo y en invernadero, determinando que el 55% de las veces, las plantas en ensayos de campo eran más sensibles que en invernadero. Contrariamente un estudio de datos de Dow AgroSciences mostró que las plantas en invernadero eran más sensibles que en el campo en un 90% de las especies ensayadas.

Aunque comúnmente se ha atribuido la fitotoxicidad del alpechín y alpeorujo a la presencia de fenoles basándose en numerosos estudios que, por un lado relacionan la disminución del contenido fenólico con la disminución de la fitotoxicidad y por otro han demostrado que los ácidos fenólicos tienen efectos tóxicos en las plantas, dicha fitotoxicidad es una propiedad muy compleja desde que más de un compuesto puede ser el responsable de ella (Wang *et al.*, 1967; Nandakumar y Rangaswamy, 1985; Fiestas Ros de Ursinos, 1986; Capasso *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2002). Se ha observado que los extractos más tóxicos del alpechín fueron aquellos que extraían sustancias polares muy ricas en fenoles (acetato de etilo y n-propanol) (Rodríguez *et al.*, 1988). El acetato de etilo es muy eficiente en la extracción a partir de este tipo de residuos de compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Visioli *et al.*, 1999), que han sido considerados los principales causantes de su fitotoxicidad (Della Greca *et al.*, 2001). En cambio en nuestros ensayos, al realizar un fraccionamiento físico del alpeorujo mediante extracción orbital, observamos que el extracto acuoso fue el más fitotóxico sobre la

germinación de las semillas de berro. Este efecto puede atribuirse a un efecto de concentración ya que todos los extractos utilizados se aplicaron a igual concentración, y cada uno de estos puede mostrar fitotoxicidad en un rango de concentración diferente (Li *et al.*, 1993). El hecho de que los fenoles presentes en el alpechín sean los responsables exclusivos de su fitotoxicidad ha sido generalmente aceptado pero no claramente demostrado ya que en algunos estudios se ha observado que cuando se extraen fenoles del alpechín este sigue siendo fitotóxico, lo que sugiere que otros componentes presentes en estos residuos, bien directamente o a través de una acción sinérgica con los fenoles, contribuyen a su fitotoxicidad (Rodríguez *et al.*, 1988; Capasso *et al.*, 1992). De hecho se han encontrado que otras sustancias como ácidos grasos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, ácidos volátiles, sales y su bajo pH pueden ser también responsables de la fitotoxicidad de residuos procedentes de la extracción del aceite de oliva (Pérez *et al.*, 1980; Saviozzi *et al.*, 1991).

Tras el fraccionamiento físico orbital del alpeorujo, los residuos resultantes (alpeorujos extractados) mostraron una fitotoxicidad proporcional a la eliminada por la extracción, de modo que el alpeorujo extractado menos fitotóxico fue aquel que se extrajo con agua, puesto que el extracto acuoso obtenido de esta extracción fue el que más inhibió el porcentaje de germinación de semillas de berro. Y, por otro lado, el alpeorujo extractado con acetato de etilo provocó una inhibición drástica del crecimiento de plantas de tomate ya que el extracto de acetato de etilo mostró poca fitotoxicidad. El fraccionamiento físico orbital del alpeorujo no eliminó en general la fitotoxicidad del residuo, tan solo la extracción con agua llegó a disminuirla considerablemente.

El soxhlet constituye un sistema de extracción de los compuestos presentes en el alpeorujo más eficaz ya que utiliza la temperatura para favorecer el proceso extractivo (Mulinacci *et al.*, 2005). Con este tipo de extracción, el extracto de acetato de etilo resultó más fitotóxico que con la extracción orbital, debido posiblemente a una mayor eficacia en la extracción, mientras que el extracto acuoso III mostró una menor fitotoxicidad respecto a la extracción orbital.

La extracción secuencial de alpeorujo con soxhlet mostró como a medida que se eliminaron los compuestos más polares la fitotoxicidad fue menor, de manera que se manifiesta claramente el poder fitotóxico de los extractos constituidos por fenoles (de acetato de etilo y propanol) al igual que se observó en estudios anteriores realizados en alpechín (Rodríguez *et al.*, 1988, Capasso *et al.* 1992, Della Greca *et al.*, 2001).

También se observa en la extracción secuencial con soxhlet como la interacción de compuestos de diferente naturaleza puede potenciar la fitotoxicidad ya que de forma individual los diferentes extractos no mostraron tanta fitotoxicidad como el alpeorajo sin tratar.

En las fracciones sólidas de alpeorajo extractado en soxhlet se observó también como a medida que se eliminaron diferentes componentes mediante la extracción secuencial, el residuo resultante se mostró menos fitotóxico llegando a eliminarse la fitotoxicidad del alpeorajo a partir de la extracción con metanol (Metanol y Agua I), ya que superó el índice de germinabilidad de 60%, límite por debajo del cual un producto orgánico se considera fitotóxico (Zucconi *et al.*, 1981). Considerando la fracción más contaminante citada en la literatura (acetato de etilo) y la más fitotóxica encontrada en nuestros ensayos previos con extracción orbital (agua), cabe esperar que el sólido resultante tras una extracción secuencial en soxhlet con acetato de etilo y agua (Fracción Agua II), muestre una fitotoxicidad ínfima, en cambio no se eliminó toda su fitotoxicidad quizás debido a que no extrae sustancias no solubles que son fitotóxicas. Se observó un comportamiento similar en el alpeorajo extractado con agua (Agua III), aunque extrajo suficientes sustancias fitotóxicas como para disminuir la fitotoxicidad del residuo sobre la germinación de semillas de berro cuando se aplicó a la concentración del 3%.

A la luz de los resultados, parece ser que el efecto en la inhibición de la germinación no se debe exclusivamente a sus constituyentes fenólicos o a sus constituyentes solubles, sino conjuntamente a ambos componentes. En este tipo de extracción con soxhlet, de forma aislada, la contribución proporcional a la fitotoxicidad de la parte fenólica es mayor que la de otras sustancias.

Capítulo II



*Uso de los hongos saprobios para la
eliminación de la fitotoxidad del alpeorujo*

II. Uso de los hongos saprobios para la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó

2.1. Efecto de los metabolitos secundarios producidos por hongos saprobios en el crecimiento de plantas

Objetivo

Es conocido que ciertos hongos filamentosos, dependiendo del medio donde se cultiven durante su metabolismo producen sustancias capaces de causar enfermedades en las cosechas, conocidas como micotoxinas (Lugauskas y Stakeniene, 2002).

Mediante este ensayo se pretende comprobar el efecto que tiene sobre el desarrollo de las plantas los metabolitos secundarios que los hongos saprobios excretan al medio de cultivo durante su crecimiento.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Se cultivaron quince hongos saprobios en un medio de cultivo Czapek durante 15 días, transcurrido este tiempo el medio se filtró y se utilizó para determinar el efecto que producen sobre el crecimiento de plantas de tomate los metabolitos secundarios que generan estos hongos.

El experimento se diseñó con dos factores de variación. El primer factor fue el crecimiento de los distintos hongos saprobios en medio Czapek con 16 tratamientos: Control (sin hongo), con los hongos saprobios del suelo: *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *M. racemosus*, *P. chrysogenum-10*, *P. chrysogenum* y los hongos saprobios de la madera: *Pl. pulmonarius*, *Pl. eryngii*, *Ph. chrysosporium*, *C. rigida*, *T. versicolor*, *T. trogii*, *Py. cinnabarinus*, *Phl. radiata* y *Fo. sclerodermeus*. El segundo factor que se tuvo en cuenta fue la cantidad de medio de crecimiento de los hongos saprobios añadido a la solución nutritiva Hewitt donde crecieron las plantas: 0, 2,5, 5, 10, 15, 25 y 50%.

Sistema de cultivo

Este experimento se realizó en tubos de vidrio con 15 ml de solución nutritiva Hewitt a los que se añadió distintos porcentajes de medio Czapek no incubado (Control) o incubado con los distintos hongos saprobios. Semillas de tomate esterilizadas en superficie y pregerminadas en placa Petri se seleccionaron en base a su tamaño y se transfirieron a los tubos. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas durante 15 días y tras la cosecha se determinó el peso seco de la parte aérea después de secarlas en estufa durante 48 h a 70 °C.

Resultados

Los resultados de este experimento muestran que algunos hongos saprobios del suelo produjeron sustancias durante su crecimiento que modificaron negativamente el desarrollo de las plantas de tomate, así el medio de crecimiento de *P. chrysogenum* añadido al cultivo de plantas de tomate disminuyó el peso seco de estas a todas las dosis aplicadas (Tabla 1). Tras el crecimiento de *P. chrysogenum*-10, el medio de cultivo disminuyó el crecimiento de plantas de tomate en concentraciones superiores al 15% mientras que *F. oxysporum* y *F. lateritium* inhibieron el crecimiento de plantas de tomate solo cuando se administraron al medio de crecimiento en concentraciones superiores al 25%. El crecimiento de los hongos saprobios de la madera *Pl. pulmonarius*, *Pl. eryngii*, *Ph. chrysosporium*, *C. rigida*, *T. versicolor*, *T. trogii*, *Py. cinnabarinus*, *Phl. radiata* y *Fo. sclerodermeus* no produjo efecto alguno sobre el crecimiento de las plantas de tomate. Es importante reseñar que no se observó en ningún caso incremento del peso seco de la parte aérea de plantas de tomate tras la aplicación de diferentes concentraciones del medio de cultivo de los distintos hongos saprobios ensayados (Tabla 1).

Tabla 1. Peso seco de la parte aérea (mg) de plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) cultivadas en presencia de distintas concentraciones de medio de cultivo en el que se habían cultivado los distintos hongos saprobios. Los valores de cada columna seguidos por la misma letra no son significativos de acuerdo al test de Tukey ($P \leq 0,05$).

Medio cultivo hongos							
Tratamiento	0%	2,5%	5%	10%	15%	25%	50%
Control	8,2 abc	9,9 b	8,9 bc	9,7 bcd	10,1 cd	13,3 ef	13,8 c
<i>F. lateritium</i>	8,2 bc	9,4 b	7,0 ab	7,1 abc	7,7 bcd	6,6 bcd	6,5 abc
<i>F. oxysporum</i>	8,2 abc	7,1 ab	7,1 ab	4,5 ab	7,3 bc	4,3 abc	2,2 ab
<i>F. graminearum</i>	8,4 c	10,3 b	11,1 bc	10,0 bcd	11,2 cd	11,4 def	13,9 c
<i>M. racemosus</i>	8,1 abc	7,1 ab	9,5 bc	9,7 bcd	8,0 bcd	10,6 cdef	9,5 abc
<i>P. chrysogenum</i>¹⁰	8,1 abc	10,0 b	6,8 ab	4,6 ab	4,4 ab	2,0 ab	1,9 ab
<i>P. chrysogenum</i>	8,1 ab	3,0 a	3,1 a	1,6 a	1,3 a	1,3 a	1,0 a
<i>Pl. pulmonarius</i>	8,2 abc	10,4 b	6,8 ab	8,6 bcd	7,5 bc	12,2 ef	10,8 abc
<i>Pl. eryngii</i>	8,2 abc	10,1 b	8,1 abc	8,5 bcd	10,7 cd	14,3 ef	16,5 c
<i>Ph. chrysosporium</i>	8,1 ab	9,9 b	13,2 c	11,4 cd	13,3 d	15,2 f	14,8 c
<i>C. rigida</i>	8,1 abc	9,7 b	6,4 ab	13,5 d	13,7 d	15,6 f	17,0 c
<i>T. versicolor</i>	8,1 ab	8,5 ab	8,7 abc	9,4 bcd	10,8 cd	9,1 cde	10,4 abc
<i>T. trogii</i>	7,9 a	7,4 ab	6,1 ab	6,6 abc	8,6 bcd	10,1 def	13,1 bc
<i>Py. cinnabarinus</i>	8,1 abc	7,1 ab	9,9 bc	9,6 bcd	9,3 bcd	9,6 de	8,0 abc
<i>Ph. radiata</i>	8,2 abc	7,8 ab	6,5 ab	9,1 bcd	7,0 abc	11,5 def	8,2 abc
<i>Fo. sclerodermeus</i>	8,1 abc	10,8 b	7,6 ab	8,7 bcd	10,2 bcd	11,2 def	13,0 bc

2.2. Condiciones experimentales para el estudio de reducción de fitotoxicidad del alpeorujó por hongos saprobios

2.2.1. Selección de hongos que disminuyen la fitotoxicidad del alpeorujó

Objetivo

Se sabe que la materia orgánica presente en el alpeorujó contribuye a sus efectos fitotóxicos pero además puede ser una fuente de crecimiento para los hongos (Galli *et al.*, 1988). Los hongos saprobios, gracias a su diversidad metabólica, pueden crecer en múltiples sustratos entre ellos el alpeorujó, degradando los componentes tóxicos de estos. Mediante este ensayo se pretende estudiar el comportamiento de distintos hongos del suelo y de la madera en la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó.

Materiales y métodos

Se cultivaron dieciséis hongos saprobios durante 15 días en extracto acuoso de alpeorujó obtenido tal y como se describe en el capítulo general de Materiales y Métodos. Tras el crecimiento de los hongos se utilizaron los extractos acuosos de alpeorujó para determinar su fitotoxicidad en plantas de tomate.

En este experimento se consideraron dos factores de variación: (1) el factor extracto de alpeorujó no incubado (Control) e incubado con los hongos saprobios *F. lateritium*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *M. racemosus*, *P. chrysogenum-10*, *P. chrysogenum*, *Pl. pulmonarius*, *Pl. eryngii*, *Ph. chrysosporium*, *C. rigida*, *T. versicolor*, *T. trogii*, *Py. cinnabarinus*, *Phl. radiata* y *Fo. sclerdermeus*; (2) el factor de diferentes cantidades de extracto acuoso de alpeorujó tratado con los hongos saprobios aplicadas al medio de crecimiento de las plantas de tomate (2,5, 5, 10 y 15%). Como controles se utilizaron plantas cultivadas en ausencia de extracto acuoso de alpeorujó. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

El experimento se realizó en tubos de vidrio con 15 ml de solución nutritiva Hewitt a las que se añadió diferentes proporciones (0, 2,5, 5, 10 y 15%) de extractos de

alpeorujos incubados o no con los hongos saprobios. Semillas de tomate esterilizadas en superficie y pregerminadas en placa Petri, al alcanzar el tamaño adecuado, se transfirieron a los tubos. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Tras 15 días de crecimiento se determinó el peso seco de la parte aérea después de su secado a 70 °C durante 48 h en estufa.

Resultados

El extracto acuoso de alpeorujos presenta marcados efectos fitotóxicos sobre las plantas de tomate ya que disminuye su peso seco un 82% cuando éste se aplicó a la dosis del 2,5% (Tabla 2). La incubación del extracto acuoso de alpeorujos con los hongos *F. lateritium*, *F. graminearum*, *P. chrysogenum*, *T. trogii* y *Fo. sclerodermeus* no aumentó el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate. Sin embargo *F. oxysporum*, *M. racemosus*, *P. chrysogenum*-10, *Pl. pulmonarius*, *Pl. eryngii*, *Ph. chrysosporium*, *C. rigida*, *T. versicolor*, *Py. cinnabarinus* y *Phl. radiata* disminuyeron el efecto fitotóxico del extracto acuoso de alpeorujos aunque de distinta manera según los porcentajes de extracto añadido al medio de cultivo. Así *F. oxysporum*, *M. racemosus*, *Pl. pulmonarius* y *C. rigida* aumentaron el peso de la parte aérea de plantas de tomate solo cuando se añadió extracto acuoso de alpeorujos incubado a bajas dosis. Sin embargo los hongos *P. chrysogenum*-10, *Pl. eryngii*, *Ph. chrysosporium*, *T. versicolor*, *Py. cinnabarinus* y *Phl. radiata* redujeron la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujos cuando este se aplicó a cualquier dosis al medio de cultivo (Tabla 2). *T. versicolor* eliminó la fitotoxicidad del extracto acuoso aplicado a la dosis del 2,5% ya que igualó el peso seco de las plantas de tomate a los controles.

Capítulo II

Tabla 2. Peso seco de la parte aérea (mg) de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) cultivadas sin extracto acuoso de alpeorujo (0%) y en presencia de distintas concentraciones de extracto acuoso de alpeorujo sin incubar (Control) o incubado con los diferentes hongos. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($P \geq 0,05$).

Extracto acuoso de alpeorujo					
Tratamiento	0%	2,5%	5%	10%	15%
Control	8,1 c	1,4 a	1,2 a	0,4 a	0,3 a
<i>F. lateritium</i>	8,0 abc	3,3 abcd	2,3 abc	1,1 abc	0,6 a
<i>F. oxysporum</i>	7,9 a	4,3 bcd	1,5 a	0,8 abc	0,7 ab
<i>F. graminearum</i>	8,1 abc	2,5 ab	1,4 a	1,1 abc	0,5 a
<i>M. racemosus</i>	8,1 abc	4,2 bcd	2,2 abc	2,1 def	0,4 a
<i>P. chrysogenum-10</i>	8,0 abc	4,3 bcd	3,5 bcd	1,5 bcd	1,0 bc
<i>P. chrysogenum</i>	8,0 abc	2,8 abc	2,3 abc	0,9 abc	0,4 a
<i>Pl. pulmonarius</i>	8,1 abc	3,8 bcd	2,0 ab	0,7 abc	0,3 a
<i>Pl. eryngii</i>	8,1 bc	5,2 d	2,6 bc	1,5 cde	1,5 cd
<i>Ph. chrysosporium</i>	8,0 abc	4,1 bcd	3,9 cde	1,5 bcd	1,2 bcd
<i>C. rigida</i>	7,9 a	4,1 bcd	1,3 a	0,7 abc	0,5 a
<i>T. versicolor</i>	8,0 ab	7,9 e	3,2 bcd	2,9 f	1,7 d
<i>T. trogii</i>	8,0 ab	3,5 abcd	2,1 ab	0,5 ab	0,4 a
<i>Py. cinnabarinus</i>	8,0 ab	5,6 d	4,7 e	2,1 ef	1,4 cd
<i>Phl. radiata</i>	8,1 abc	5,5 d	4,4 de	2,3 ef	1,5 d
<i>Fo. sclerodermeus</i>	8,1 abc	2,7 ab	1,3 a	0,5 ab	0,3 a

2.2.2. Efecto de distintos medios de crecimiento de hongos saprobios en la reducción de fitotoxicidad del alpeorujó

Crecimiento de los hongos saprobios en extractos de alpeorujó

Objetivo

Mediante este ensayo se pretende ver la capacidad de los hongos saprobios para crecer en extractos de alpeorujó y ver si se produce una inhibición del crecimiento de dichos hongos por el efecto de los componentes solubles de estos extractos.

Materiales y métodos

Este ensayo se realizó cultivando los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* en placas Petri con MEA o agar como medios de cultivo a los que se les añadieron distintas proporciones de extracto acuoso de alpeorujó (0, 5, 25 y 50%). Los hongos se cultivaron en estufa a 28 °C durante 4, 5, 6 y 7 días (el tiempo necesario para que el hongo ocupara toda la placa Petri) y posteriormente se les determinó el diámetro de crecimiento. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Resultados

El crecimiento de los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* en los medios MEA y agar no disminuyeron en presencia de distintas concentraciones de extracto acuoso de alpeorujó (Tabla 3). Se ha observado sin embargo, que cuando se añadió el extracto acuoso de alpeorujó a los medios de cultivo de los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* se favoreció el desarrollo de los mismos en todos los casos aunque el efecto fue diferente dependiendo del medio de cultivo, concentración de extracto acuoso de alpeorujó y tiempo de incubación. El crecimiento de *C. rigida* aumentó por la aplicación de cualquier concentración de extracto acuoso de alpeorujó añadido a los dos medios de cultivos y a todos los tiempos de incubación, mientras que dicho extracto solo estimuló el crecimiento de *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* en determinadas circunstancias. Así estos hongos aumentaron su crecimiento cuando se

Capítulo II

añadió extracto acuoso de alpeorajo en medio agar, pero en el medio MEA solo se incrementó el crecimiento cuando se aplicó a dosis intermedias.

Tabla 3. Diámetro de crecimiento de los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* cultivados en medio MEA o agar en presencia de 0, 5, 25 y 50% de extracto acuoso de alpeorajo (ADOR) durante distintos tiempos de incubación (4, 5, 6 y 7 días). Las letras distintas en cada columna para cada hongo indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Medio	ADOR (%)	4 días	5 días	6 días	7 días
<i>C. rigida</i>	MEA	0	3,3 ab	4,7 b	6,0 b	7,0 b
		5	4,5 d	6,1 cd	7,5 c	8,8 d
		25	4,7 d	6,5 d	8,0 c	8,8 d
		50	4,3 cd	6,0 cd	7,8 c	8,8 d
	Agar	0	2,5 a	3,3 a	4,5 a	5,3 a
		5	4,3 cd	6,2 cd	7,4 c	8,8 d
		25	4,0 bcd	6,0 cd	7,5 c	8,8 d
		50	3,6 bc	5,3 bc	6,4 b	7,9 c
<i>T. versicolor</i>	MEA	0	2,9 b	4,4 bc	5,8 b	7,4 b
		5	3,5 bcd	4,4 b	6,6 c	7,9 bc
		25	4,2 e	5,5 d	7,7 d	8,7 c
		50	3,3 bc	4,4 b	6,2 bc	7,9 bc
	Agar	0	2,2 a	3,1 a	4,6 a	5,6 a
		5	3,5 bcd	5,0 cd	7,4 d	8,6 c
		25	4,0 de	5,2 d	7,5 d	8,6 c
		50	3,7 cde	4,4 bc	5,9 bc	7,2 b
<i>Py. cinnabarinus</i>	MEA	0	2,3 bc	3,6 c	4,2 c	5,2 de
		5	2,9 d	3,9 c	4,9 d	5,6 e
		25	2,7 d	3,7 c	4,6 d	5,3 de
		50	2,1 b	2,7 ab	3,5 ab	4,4 ab
	Agar	0	1,8 a	2,5 a	3,1 a	3,9 a
		5	2,3 bc	3,1 b	3,8 bc	4,5 bc
		25	2,4 c	3,1 b	3,9 bc	4,9 cd
		50	2,1 b	2,7 a	3,3 a	4,0 a

Crecimiento de los hongos saprobios en distintos medios de cultivo

Objetivo

Los hongos saprobios son microorganismos que se caracterizan por colonizar la mayoría de los sustratos orgánicos. Debido a que las condiciones de cultivo de los hongos saprobios juegan un papel importante en la producción de enzimas y por tanto en la degradación de sustancias tóxicas, en este ensayo pretendemos optimizar tanto el crecimiento de los hongos saprobios en extractos de alpeorujó como su potencial de reducción de fitotoxicidad. Para ello hemos utilizado el extracto de acetato de etilo realizado en soxhlet como modelo por ser uno de los más fitotóxicos.

Materiales y métodos

Los hongos saprobios *Phl. radiata*, *Py. cinnabarinus* y *C. rigida* se cultivaron en extractos de acetato de etilo de alpeorujó con diferentes concentraciones de sales minerales y de fuentes de carbono. Al extracto de acetato de etilo de alpeorujó obtenido tras una extracción en soxhlet (1:4 p:v), ajustado a pH 5,5 tal y como se describe anteriormente en el capítulo general de Material y Métodos, se le añadió diferentes porcentajes de sales minerales del medio Czapek 0, 25, 50 y 100% y de sacarosa 0, 25, 50 y 100%.

Los hongos saprobios se cultivaron en los medios anteriormente descritos durante 15 días a 28 °C en agitación. Transcurrido este tiempo el micelio se secó en estufa durante 72 h a 70 °C y se determinó su peso seco. El medio filtrado se empleó para la determinación de fenoles siguiendo el método de Ribereau-Gayon (1968) utilizando el ácido tánico como estándar.

Resultados

2.2.2.1. Efecto de la aplicación de sales

Como muestra la Fig. 1A, *Phl. radiata* creció significativamente más cuando se incubó en extracto de acetato de etilo al que se añadió el 100% de sales aunque la ausencia de estas sales también produjo un buen crecimiento. La presencia de 25% y

Capítulo II

50% de sales en el extracto de alpeorujo redujo el crecimiento del hongo saprobio hasta un 50%. El contenido total de fenoles del extracto de alpeorujo incubado con *Phl. radiata* varió en función de las distintas proporciones de sales añadidas al medio de cultivo (Fig. 1B). Se observó una gran degradación del contenido fenólico en todos los tratamientos estudiados aunque los efectos más acusados se observaron en los tratamientos sin sales o con 100% de estas. Se observó una relación entre el crecimiento de *Phl. radiata* en extractos de acetato de etilo de alpeorujo con sales y su capacidad de degradar fenoles. Ya que *Phl. radiata* creció mejor en extracto de acetato de etilo con 100% de sales y además disminuyó un gran contenido de fenoles, se eligió este medio para posteriores ensayos.

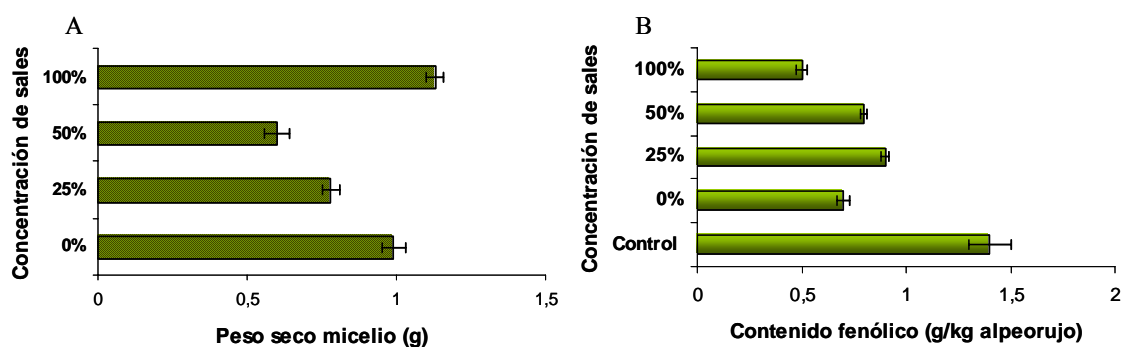


Fig. 1. (A) Peso seco del micelio de *Phl. radiata* cultivado en extracto de acetato de etilo de alpeorujo con diferentes proporciones de sales (0, 25, 50 y 100%). (B) Contenido fenólico de extracto de acetato de etilo de alpeorujo con diferentes proporciones de sales (0, 25, 50 y 100%) sin incubar (Control) o incubados con *Phl. radiata*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

2.2.2.2. Efecto de la aplicación de fuente de carbono

Tal y como puede observarse en la Fig. 2, *C. rigida*, *Py. cinnabarinus* y *Phl. radiata* crecieron con todos los medios de cultivo utilizados aunque este crecimiento aumentó conforme se aumentaba el porcentaje de sacarosa en el medio. El mayor crecimiento de los hongos se detectó en extracto de acetato de etilo con 100% de sacarosa.

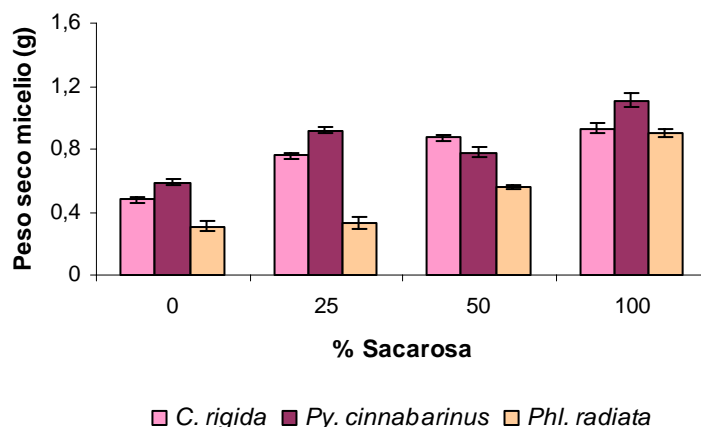


Fig. 2. Peso seco del micelio de *C. rigida*, *Py. cinnabarinus* y *Phl. radiata* cultivado en extractos de acetato de etilo de alpeorujó con diferentes proporciones de sacarosa (0, 25, 50 y 100%). Las barras en cada columna indican el error estándar.

Los resultados muestran como la degradación de fenoles por *C. rigida* en presencia de 0, 25 y 50% de sacarosa es muy alta llegando a degradar hasta un 91% del contenido fenólico del extracto (Fig. 3). Sin embargo, *C. rigida* no produjo degradación de fenoles tras la aplicación del 100% de sacarosa en el extracto de acetato de etilo de alpeorujó. La incubación del extracto de acetato de etilo con *Py. cinnabarinus* redujo significativamente el contenido de fenoles en todas las concentraciones de sacarosa utilizadas aunque su efecto fue mayor en extractos con un 50% de sacarosa. La degradación de fenoles por *Phl. radiata* fue evidente solamente cuando no se añadió fuente de carbono externa al extracto de acetato de etilo de alpeorujó ya que el crecimiento de este hongo en medios con distintas concentraciones de sacarosa no modificó el contenido fenólico de este. Ya que los hongos saprobios ensayados produjeron mayor descenso de fenoles cuando se cultivaban en ausencia de sacarosa, se eligió este medio para posteriores ensayos.

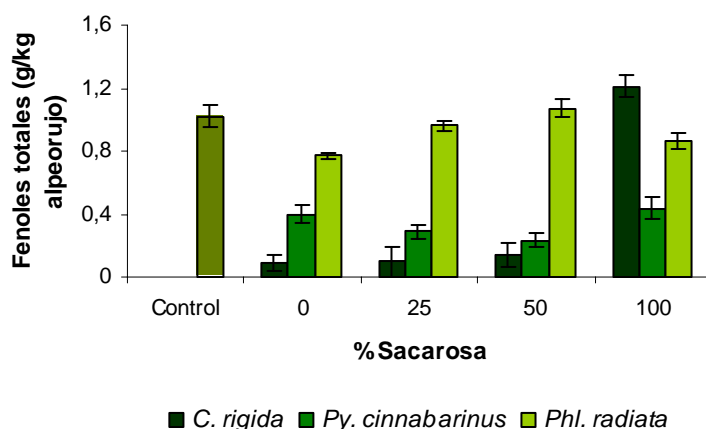


Fig. 3. Contenido fenólico de extractos de acetato de etilo de alpeorujó con diferentes proporciones de sacarosa (0, 25, 50 y 100%) sin incubar (Control) o incubados con *C. rigida*, *Py. cinnabarinus* y *Phl. radiata*. Las barras en cada columna indican el error estándar.

2.2.3. Efecto del tiempo de incubación de los hongos saprobios en la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujó

Objetivo

Una vez determinado el medio de crecimiento óptimo de los hongos saprobios (extracto de alpeorujó + 100% sales + 0% sacarosa) para llevar a cabo los ensayos de detoxificación del alpeorujó, se estudió la influencia del tiempo de crecimiento de los cultivos fúngicos. Con ello se pretendía ver como se modificaba la toxicidad del extracto y los parámetros implicados en la eliminación de dicha fitotoxicidad con el tiempo de incubación de los hongos saprobios en los extractos de alpeorujó.

Materiales y métodos

Se cultivaron los hongos *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* en extracto acuoso de alpeorujó con 100% sales y sin fuente adicional de carbono durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días. La inoculación se realizó con 2 g de micelio de inóculo de dichos hongos obtenidos tras 15 días de cultivo. Tras su crecimiento, la fracción extracelular se separó del micelio y se utilizó para la determinación de fitotoxicidad, contenido fenólico y

actividad lacasa. Además se determinó el peso seco del micelio tras su secado en estufa durante 72 h a 70 °C.

Para el ensayo de fitotoxicidad se tuvieron en cuenta dos factores de variación, uno fue el tiempo de incubación de los hongos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 días) y otro la aplicación de distintas proporciones de extracto de alpeorujó tratado con los hongos saprobios (0, 2,5, 5, 10 y 15%).

La determinación de fitotoxicidad se realizó en tubos de vidrio con 15 ml de solución nutritiva Hewitt a los que se les añadieron las distintas proporciones de extracto acuoso de alpeorujó no incubado (Control) o incubado con los hongos durante distintos tiempo de incubación. Semillas de tomate esterilizadas en superficie y seleccionadas en base a su tamaño se transfirieron a los tubos.

Las plantas se cultivaron durante 15 días en cámara de cultivo bajo condiciones controladas. Una vez cosechadas se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas de tomate tras su secado en estufa durante 48 h a 70 °C.

A los extractos acuosos de alpeorujó incubados con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* se les determinó la biomasa fúngica así como el contenido fenólico y la actividad lacasa siguiendo la metodología descrita en el capítulo general de Materiales y Métodos.

Resultados

Ensayo de fitotoxicidad

Los resultados del estudio muestran que el extracto acuoso de alpeorujó disminuyó el peso seco de la parte aérea en plantas de tomate a todas las dosis utilizadas, siendo este efecto mayor a medida que se aumenta la dosis de extracto (Fig. 4). La aplicación de extracto acuoso a dosis del 2,5% redujo el peso de plantas de tomate en un 60%, porcentaje que aumentó hasta un 90% cuando se aplicó el extracto a la mayor dosis utilizada (15%).

La inoculación del extracto acuoso con *C. rigida* produjo un incremento del peso seco de la parte aérea de plantas de tomate a todas las dosis aplicadas, de hecho se observó que en solo 5 días de incubación se consiguió eliminar el 50% de la fitotoxicidad (Fig. 4A). La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con *C. rigida* redujo totalmente la toxicidad cuando se aplicó a la dosis del 2,5%. La disminución de los efectos fitotóxicos del extracto acuoso de alpeorujó por la incubación del hongo *C.*

rigida aumentaron conforme se incrementó el tiempo de incubación del hongo hasta alcanzar el máximo de detoxificación a los 15 días (Fig. 4A). Incluso, la aplicación del 2,5% de extracto acuoso de alpeorujó incubado durante 15 días incrementó el peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en comparación con el de plantas cultivadas en ausencia de alpeorujó

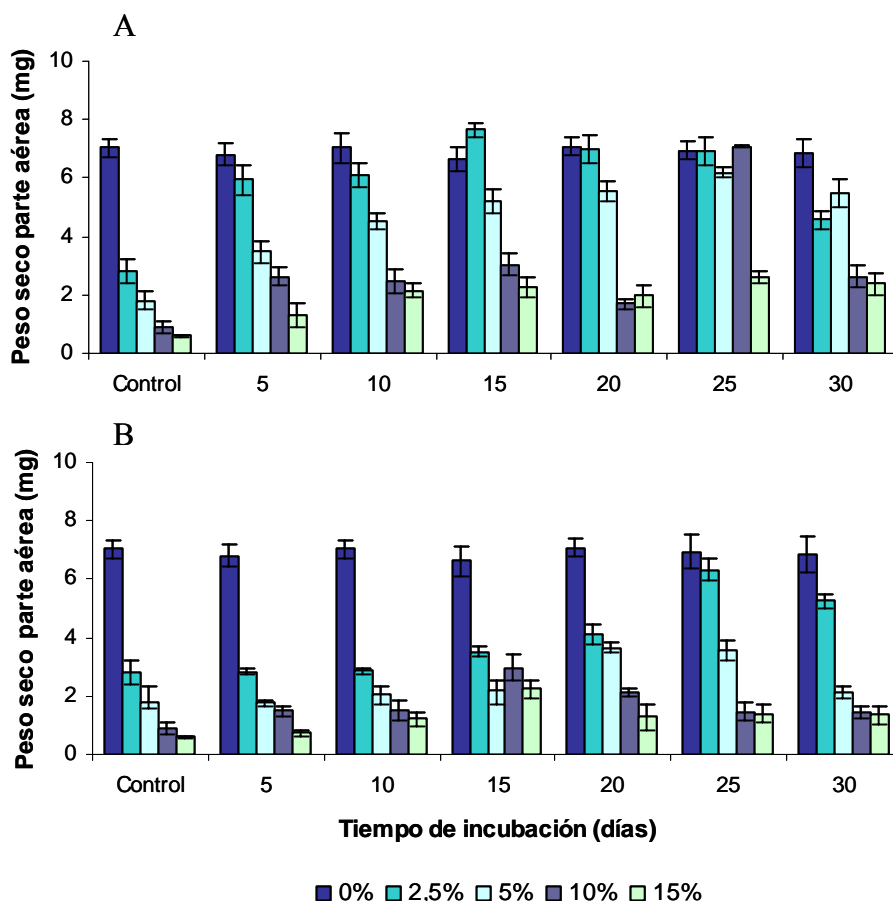


Fig. 4. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L) cultivadas en presencia de distintas concentraciones de extracto acuoso de alpeorujó sin incubar (Control) o incubado con *C. rigida* (A) y *Py. cinnabarinus* (B) a diferentes tiempos de incubación. Las barras en cada columna indican el error estándar.

La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con el hongo *Py. cinnabarinus* produjo efectos diferentes del observado anteriormente con *C. rigida* ya que *Py. cinnabarinus* necesitó más tiempo de incubación (20 días) para reducir el efecto fitotóxico del alpeorujó sobre el peso seco de la parte aérea de tomate (Fig. 4B). La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con *Py. cinnabarinus* produjo menor descenso de fitotoxicidad al aplicarlos a plantas de tomate comparado con los descensos producidos por *C. rigida* ya que a igual tiempo de incubación *C. rigida* igualó el peso

seco de las plantas a las de los controles mientras que *Py. cinnabarinus* solo redujo esta fitotoxicidad.

Biomasa fúngica

El crecimiento de los hongos *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* en el extracto acuoso de alpeorujó, medido mediante la determinación de la biomasa fúngica fue similar hasta los 25 días de incubación mientras que a los 30 días de cultivo *C. rigida* experimentó un mayor desarrollo (Fig. 5).

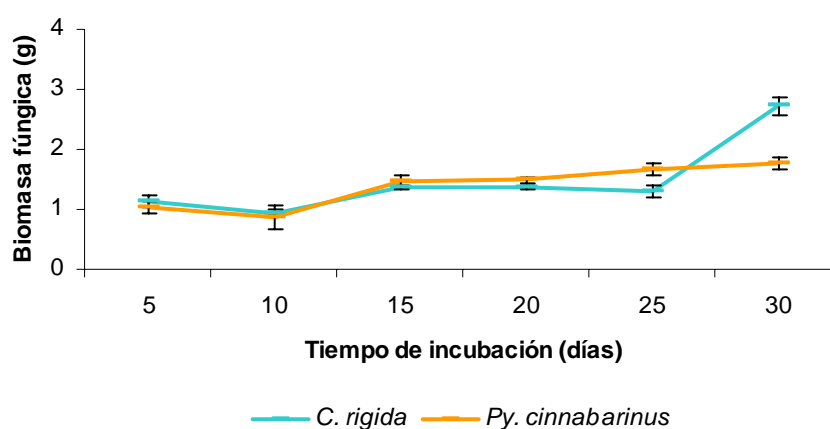


Fig. 5. Biomasa fúngica de *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* crecidos en extracto acuoso de alpeorujó durante diferentes tiempos de incubación. Las barras en cada columna indican el error estándar.

Contenido fenólico

El contenido total de fenoles detectados en el extracto acuoso fue de 28 g/kg alpeorujó (Fig. 6). La incubación del extracto en agitación a 28 °C durante 30 días no afectó su contenido fenólico. Sin embargo la inoculación de extracto acuoso con los hongos saprobios utilizados en el ensayo disminuyó significativamente dicho contenido. El máximo de degradación fenólica, un 65% del contenido inicial, se observó en ambos hongos a los 15 días de incubación, sin embargo *Py. cinnabarinus* comenzó la degradación a partir de los 5 días de incubación mientras que *C. rigida* necesitó 10 días.

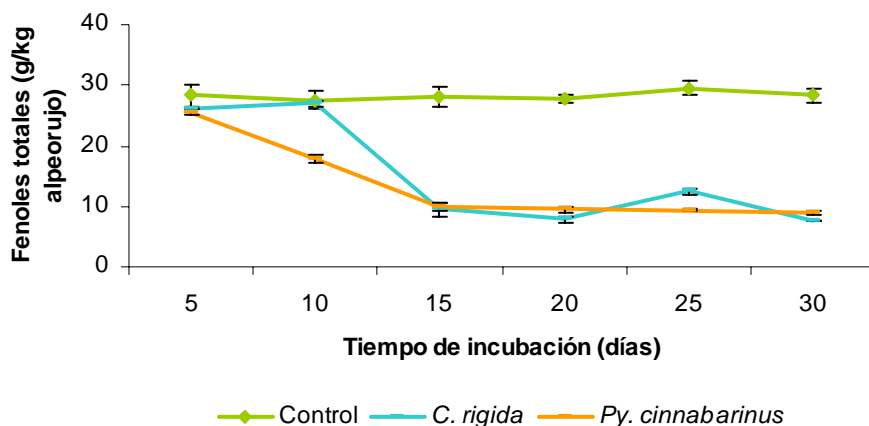


Fig. 6. Contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorujó sin incubar (Control) o incubado con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* durante diferentes tiempos de incubación. Las barras de error expresan la desviación estándar.

Los fenoles detectados mediante cromatografía en capa fina en el extracto acuoso de alpeorujó fueron el hidroxitirosol y p-tirosol. Tras la incubación con los hongos seleccionados se pudo observar que *C. rigida* eliminó el p-tirosol desde el quinto día de incubación mientras que el hidroxitirosol comenzó a degradarse a partir de los diez días de incubación. En cambio *Py. cinnabarinus* eliminó los dos fenoles detectados en el extracto acuoso de alpeorujó en los primeros días del tratamiento.

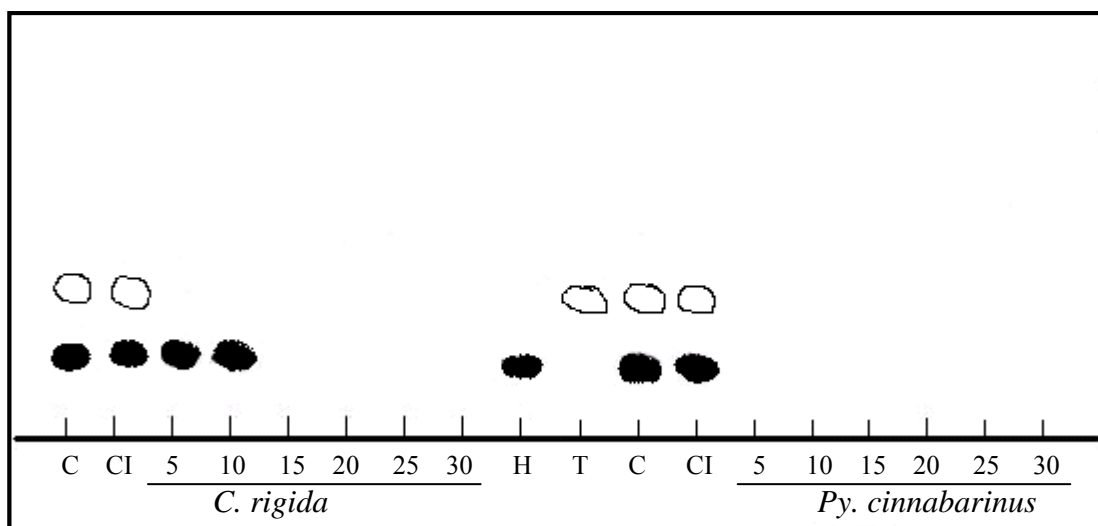


Fig. 7. Contenido fenólico detectado mediante TLC del extracto acuoso de alpeorujó sin incubar (C), incubado sin hongo (CI) o con los hongos saprobios *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días. Estándares: hidroxitirosol (H) y p-tirosol (T).

Actividad lacasa

Se detectó actividad lacasa en el extracto acuoso de alpeorujó incubado con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* (Fig. 8). La incubación del extracto con *C. rigida* mostró actividad a los 15 días de incubación y alcanzó su valor máximo a los 20 días descendiendo posteriormente la actividad. *Py. cinnabarinus*, sin embargo produjo actividad lacasa desde el quinto día de incubación alcanzando su máximo (250 mUI/g) a los 20 días de incubación, tiempo a partir del cual la actividad enzimática empezó a decrecer.

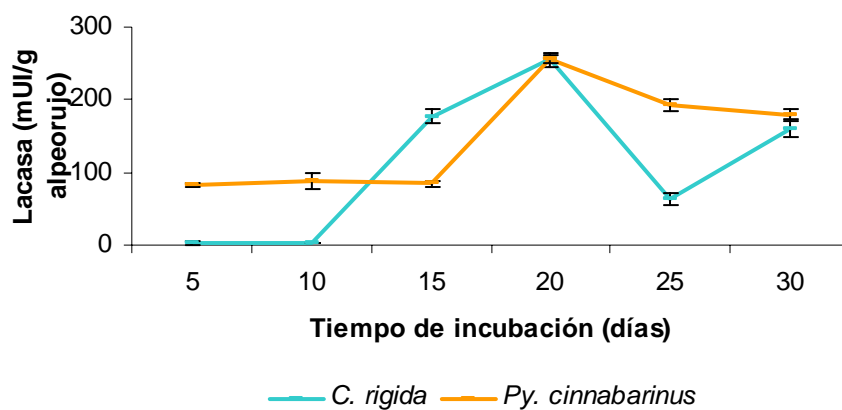


Fig. 8. Actividad lacasa en extracto acuoso de alpeorujó incubado con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* durante diferentes tiempos de incubación. Las barras de error expresan la desviación estándar.

Considerando todos estos resultados se estableció que 15 días fue el tiempo de incubación en que los hongos *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* disminuyeron de forma más efectiva la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó.

Discusión

El estudio del posible efecto de metabolitos secundarios producidos durante el desarrollo de los hongos saprobios sobre las plantas mostró que algunos hongos del suelo produjeron metabolitos capaces de disminuir el crecimiento de las plantas de tomate, mientras que los hongos de la madera no afectaron al desarrollo de las mismas.

Este tipo de sustancias son liberadas por los hongos en su proceso metabólico cuando hay una limitación de nutrientes y por tanto necesitan competir por el sustrato con bacterias o con otros hongos. Algunos hongos del suelo pueden biosintetizar metabolitos fitotóxicos en ciertos medios de cultivo (Elisashvili y Borovkov, 1975). Los hongos filamentosos del género *Fusarium*, *Aspergillus* o *Penicillium* liberan micotoxinas perjudiciales para las plantas incluidas las plantas de tomate (Isebaert *et al.*, 2005). Estos resultados indican que los efectos potenciadores o inhibidores del crecimiento de las plantas que se observen a posteriori, en el caso del alpeorujó biorremediado con los hongos de la madera, se deberán exclusivamente a la acción de dicho residuo mientras que en el caso de los hongos saprobios del suelo los efectos negativos del alpeorujó tratado con dichos hongos podrán ser debidos en parte al metabolismo del hongo. No obstante, en estudios realizados en biorrediaci3n de alpeorujó con *F. lateritium* y alpechín con *Aspergillus*, para su uso como fertilizantes, no se observó un efecto negativo sobre las plantas como consecuencia del metabolismo del hongo, detectándose en todos los casos una degradaci3n fen3lica y disminuci3n de la fitotoxicidad (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1994; Vassilev *et al.*, 1998; Cereti *et al.*, 2004; Sampedro *et al.* 2005)

Existen microorganismos del suelo capaces de disminuir la contaminaci3n que provocan los residuos agroindustriales (Moreno *et al.*, 1990). Se ha descrito que el biotratamiento del alpechín por estos hongos incrementó el crecimiento de plantas de trigo y tomate respectivamente (Cereti *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2004a). Su poder de descontaminaci3n se atribuye a su capacidad para metabolizar fenoles y estabilizar sustratos con una alta demanda química o biológica de oxígeno (Ben Hamman *et al.*, 1999). En nuestros estudios de fitotoxicidad realizados con extracto acuoso de alpeorujó incubado con hongos saprobios encontramos que de forma general los hongos saprobios de la madera fueron más eficaces en la disminuci3n de la fitotoxicidad de dicho extracto que los hongos saprobios del suelo. De hecho *P. chrysogenum*-10 fue el único de los hongos del suelo ensayados que disminuyó la fitotoxicidad a todas las dosis de extracto acuoso de alpeorujó aplicadas, mientras que los hongos de la madera *Pl. eryngii*, *Ph. chrysosporium*, *T. versicolor*, *Py. cinnabarinus* y *Phl. radiata* disminuyeron dicha toxicidad cuando se aplicó dicho extracto a cualquier dosis, llegando incluso *T. versicolor* a eliminar la fitotoxicidad producida por la dosis del 2,5% de extracto acuoso de alpeorujó. Los hongos saprobios de la madera poseen una maquinaria enzimática amplia con capacidad de degradar sustancias lignocelulósicas y de tipo fen3lico. Ciertos

hongos del suelo también son capaces de degradar fenoles gracias a la producción de enzimas del tipo catecol-dioxigenasas, fenolhidroxiliasas (Santos y Linardi, 2004) y además poseen enzimas hidrolíticas que degradan oligosacáridos y glicoproteínas presentes en las paredes celulares de restos vegetales (Tribak *et al.*, 2002) que pueden resultar fitotóxicas para la salud de las plantas (Bucheli *et al.*, 1990).

La mayoría de los estudios de degradación del alpechín y alpeorujos realizados con el empleo de hongos saprobios se han llevado a cabo con hongos saprobios de la madera dada la capacidad de estos de producir enzimas ligninolíticas (Sayadi y Ellouz, 1993; Martirani *et al.*, 1996; D'Annibale *et al.*, 1998, Pérez *et al.*, 1998; Yesilada *et al.*, 1999; Kissi *et al.*, 2001; Fountoulakis *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Fenice *et al.*, 2003; Jaouani *et al.*, 2003; Sampedro *et al.*, 2004a). Los hongos saprobios del suelo también han mostrado ser eficaces en la disminución de la fitotoxicidad de ciertos contaminantes (Regalado *et al.*, 1997). Estos hongos además contribuyen a un mejor uso de los nutrientes por las plantas (Fracchia *et al.*, 2000). Este hecho se ha visto en residuos del olivar con especies no patógenas del género *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* o *Aspergillus* e incluso *F. oxysporum* o *F. lateritium* han llegado a eliminar la fitotoxicidad del alpeorujos tras 20 semanas de incubación (Sampedro *et al.*, 2004b). Aún así hay autores que afirman que los basidiomicetes detoxifican más que los ascomicetes (Sierra-Álvarez *et al.*, 2000).

Se sabe que el alpeorujos posee nutrientes que pueden ser beneficiosos para el crecimiento de microorganismos (Sampedro *et al.*, 2005). Sin embargo, existía la posibilidad de que el extracto acuoso de alpeorujos tuviera efectos negativos sobre el crecimiento de los hongos como sucede con el alpechín ya que este residuo es capaz de inhibir el crecimiento de *Pl. ostreatus* a concentraciones mayores del 20% (Martirani *et al.*, 1996). Los hongos utilizados en nuestros experimentos no solo crecieron usando el extracto acuoso de alpeorujos como única fuente de nutrientes sino que crecieron más que cuando el medio de cultivo no contenía extracto acuoso. Los hongos crecieron de forma óptima cuando se cultivaron en presencia del 50% de extracto acuoso en el medio de cultivo.

Estudios realizados por Galli *et al.* (1988) en el reciclaje de alpechines mostraron la existencia de una correlación indirecta entre la longitud de la fase *lag* o de retardo y los rangos de dilución del alpechín cuando crecía *Pl. florida* en diferentes medios lo que sugiere la presencia de un factor inhibidor del crecimiento posiblemente unida a la presencia de fenoles en el medio. En nuestros estudios este hecho se manifiesta solo a la

concentración del 50% de extracto acuoso de alpeorujó y no se observa inhibición del crecimiento en los primeros estadios del desarrollo sino una potenciación del mismo sin observar diferencias entre el empleo de un medio MEA o agar.

En nuestros ensayos el comportamiento de *Phl. radiata* fue variable de manera que aunque su crecimiento fue máximo cuando se añadieron el 100% de las sales no se observa una relación directa entre la cantidad de sales y el crecimiento. Sin embargo sí encontramos una relación entre el crecimiento del micelio y el grado de degradación de los fenoles en extractos de acetato de etilo de alpeorujó, de manera que en ausencia de cualquier fuente carbonada y nitrogenada *Phl. radiata* utilizó los compuestos extraídos del alpeorujó con acetato de etilo como fuente nutritiva y por ello disminuyó el contenido fenólico del mismo. Se sabe que el acetato de etilo es muy eficiente en la extracción de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los residuos de la extracción del aceite de oliva (Visioli *et al.*, 1999) y que muchos microorganismos son capaces de metabolizar ácidos fenólicos (Siqueira *et al.*, 1991) y con ello suprimir los efectos fitotóxicos que éstos presentan (Vaughan *et al.*, 1983). Se ha comprobado la degradación de fenoles del alpechín variando la composición del medio de cultivo con diferentes fuentes carbonadas y nitrogenadas y se ha observado que al aumentar la concentración de nitrógeno se obtiene una mayor producción de lacasa y Mn peroxidasa lo que implica una gran transformación fenólica (Jaouani *et al.*, 2006). En nuestro caso no se apreció una relación clara entre la cantidad de fuente nitrogenada y la degradación fenólica ya que se produce degradación de fenoles tanto sin sales como en presencia de distintas concentraciones de estas.

Cuando se añadieron diferentes concentraciones de fuente carbonada al extracto de acetato de etilo de alpeorujó se observó un mayor crecimiento de los hongos saprobios en presencia de mayor cantidad de sacarosa, en cambio la degradación fenólica se produjo en ausencia o en bajas concentraciones de este azúcar con la mayoría de los hongos estudiados. El efecto de la mayor degradación fenólica en ausencia o bajas concentraciones de fuente carbono, que observamos con los hongos estudiados, se podría atribuir al hecho de que en ausencia de cualquier otra fuente carbonada, los hongos utilizan los fenoles como fuente nutritiva. Algunos autores han estudiado la eliminación de fenoles de alpechín con diferentes mohos encontrando que las condiciones de crecimiento pueden afectar a la degradación fenólica y aunque la aplicación de las diferentes cantidades de glucosa no afectaron al crecimiento de dichos hongos no se encontró una relación directa entre el crecimiento de los hongos y la

actividad enzimática de los extractos tratados (Amhajji *et al.*, 2000). Estos resultados muestran que la variabilidad de enzimas ligninolíticas en las diferentes especies de hongos y su producción depende de la composición y condiciones de cultivo lo cual afecta a la modificación fenólica (Rogalski *et al.*, 1991).

Los hongos saprobios *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* disminuyeron la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó alcanzando un óptimo a los 15 días de cultivo, periodo similar al observado por otros autores en la eliminación de la fitotoxicidad del alpechín por los hongos *C. polizona* y *L. edodes* (Vinciguerra *et al.*, 1995; Jaouani *et al.*, 2006). Durante este periodo se observó producción de actividad lacasa y disminución de fenoles por estos hongos saprobios en el extracto acuoso de alpeorujó. Algunos autores afirman que los compuestos poliméricos fenólicos presentes en el alpechín muestran una estructura similar a la lignina confiriéndole sus propiedades recalcitrantes y aportando la coloración marrón del residuo (Pérez *et al.*, 1987). Se conoce que la capacidad de degradación de lignina por los hongos de la podredumbre blanca se debe a la producción de enzimas como las lacasas, que degradan los componentes fenólicos de esta y participan por tanto en la degradación de los fenoles de residuos como el alpechín y el alpeorujó (Ruiz *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005). La producción de lacasa es una característica común de la mayoría de los hongos de la podredumbre blanca (Hatakka, 1994; Peláez *et al.*, 1995) y se ha visto la presencia de estas enzimas en hongos como *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes (Eggert *et al.*, 1996; Saparrat *et al.*, 2002). El contenido inicial de fenoles del extracto acuoso de alpeorujó comenzó a disminuir tras el tratamiento de dicho extracto durante 5 y 10 días con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus*, tiempo a partir del cual se detectó producción de actividad lacasa. En el extracto acuoso de alpeorujó se observó una relación directa entre la eliminación de fenoles y la producción de actividad lacasa detectándose un máximo de degradación fenólica a los 15 días junto a una alta producción de actividad lacasa pudiendo relacionar una implicación de dicho enzima en la transformación del contenido fenólico. A partir de los 15 días se observa una estabilización en la degradación fenólica que algunos autores achacan al agotamiento de la fuente de carbono en el medio ya que la degradación de estos por hongos de la podredumbre blanca requiere un co-substrato (Vinciguerra *et al.*, 1995).

El hidroxitirosol y el p-tirosol han sido los fenoles mayoritarios detectados en los residuos del alpechín y alpeorujó por numerosos autores aunque su concentración es mayor en el caso del alpeorujó (Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2002;

2004; Allouche *et al.*, 2004). El hidroxitirosol, conocido por sus propiedades antioxidantes también participa en los procesos de toxicidad mostrando microtoxicidad frente a bacterias (Capasso *et al.*, 1995) y fitotoxicidad selectiva dependiendo de la concentración y del tipo de planta (Capasso *et al.*, 1992). De hecho se ha observado una reducción de la fitotoxicidad del alpeorujó en plantas de tomate cuando a este le ha sido extraído todo el hidroxitirosol mediante tratamiento al vapor (Rodríguez, 2005). En la detección de hidroxitirosol y p-tirosol mediante TLC se demostró que *C. rigida* eliminó totalmente ambos fenoles a los 15 días mientras que *Py. cinnabarinus* lo hizo al inicio de la incubación. Se ha encontrado por tanto una relación entre el contenido fenólico y la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó en el caso de *C. rigida* ya que tras su incubación se observó un descenso de la fitotoxicidad a partir del quinto día, tiempo en el cual se aprecia un descenso cualitativo de fenoles aunque no cuantitativo. Estos resultados sugieren la implicación del p-tirosol en la fitotoxicidad del alpeorujó. Contrariamente en el caso de *Py. cinnabarinus* la ausencia de estos dos fenoles desde el inicio de la incubación implica que otros compuestos no identificados por esta técnica pueden estar determinando la fitotoxicidad sin poderla atribuir exclusivamente al p-tirosol. La relación existente entre la actividad lacasa, la reducción del contenido fenólico y el aumento del peso seco de las plantas de tomate en el caso de la aplicación de extracto acuoso de alpeorujó incubado durante 15 días con *C. rigida* produjo la eliminación de la fitotoxicidad y por tanto la aparición de un efecto fertilizante a la menor dosis aplicada. De estos resultados se concluye que la eliminación de fenoles por acción de la lacasa de los hongos de la podredumbre blanca puede jugar un papel muy importante en la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó.

Capítulo III



*Mecanismos de disminución/eliminación de la
fitotoxicidad de las fracciones físicas del
alpeorujo por los hongos saprobios*

III. Mecanismos de disminución/eliminación de la fitotoxicidad de las fracciones físicas del alpeorujó por los hongos saprobios

Objetivo

Se pretende eliminar la fitotoxicidad del alpeorujó fraccionándolo mediante extracciones con distintos solventes y utilizando los hongos saprobios seleccionados previamente para tal fin en las distintas fracciones. También se va a relacionar los cambios producidos en la composición química de las diferentes fracciones de alpeorujó con la reducción de su fitotoxicidad.

3.1. Extracción orbital

Materiales y métodos

Para la realización de estos ensayos se seleccionaron los hongos *P. chrysogenum*-10, *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*, un hongo saprobio del suelo y tres hongos saprobios de la madera por su eficacia en la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó. Estos hongos se inocularon en los diferentes extractos obtenidos mediante extracción orbital y en los alpeorujos extractados. Los extractos de alpeorujó se incubaron durante 15 días inoculando un homogeneizado de micelio fúngico obtenido de un cultivo de los respectivos hongos. Los alpeorujos extractados se incubaron durante 20 semanas con 6 granos de cebada incubada con los hongos objeto de estudio. Ambas incubaciones se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo general de Materiales y Métodos.

Análisis de fitotoxicidad

Ensayos de fitotoxicidad de extractos de alpeorujó

Se tuvieron en cuenta cinco factores de variación según los extractos de alpeorujó: extracto de agua I, extracto de acetato de etilo I, extracto de agua II, extracto metanólico y extracto de acetato de etilo II (Esquema 1). Cada factor se diseñó teniendo en cuenta

dos variables. La primera, el factor inoculación de los extractos de alpeorujos con hongos saprobios que contenía cinco tratamientos: extracto de alpeorujos sin incubar (control) y extracto de alpeorujos incubado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10, *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. La segunda variable consistió en las proporciones de dicho extracto (15, 10, 5 y 2,5%).

El análisis de fitotoxicidad de los extractos obtenidos en el fraccionamiento mediante extracción orbital se realizó mediante el ensayo de germinabilidad de Zucchini modificado, en semillas de berro de jardín (*L. sativum* L.).

Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Las placas Petri con las semillas se dejaron en estufa a 28 °C durante 48 h y transcurrido este tiempo se contabilizó el número de semillas germinadas por placa y la longitud de la radícula.

Ensayos de fitotoxicidad del alpeorujos extractado

El experimento se diseñó teniendo en cuenta 4 factores de variación: aplicación de alpeorujos extractados con agua I, acetato de etilo, agua II y metanol (Esquema 2). Cada factor se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera, el factor inoculación del alpeorujos con hongos saprobios que contenía 4 tratamientos: plantas sin alpeorujos (Co) y con alpeorujos incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 y *Py. cinnabarinus*. La segunda variable fue la proporción de alpeorujos, 2,5 y 5%, aplicada a las macetas. Estos experimentos se realizaron en plantas de tomate con tres repeticiones por tratamiento.

Se utilizaron macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo: arena (1:1). Las semillas de tomate se esterilizaron en superficie y tras su germinación se seleccionaron en base a la homogeneidad de tamaño, disponiendo una plántula por maceta. Los distintos alpeorujos extractados no incubados e incubados sin hongo o inoculados con los hongos saprobios durante 20 semanas se esterilizaron y se añadieron a las macetas en proporciones de 2,5 y 5%. Las plantas se fertilizaron semanalmente con 10 ml de solución nutritiva Hewitt.

Las plantas se cultivaron bajo condiciones controladas de invernadero durante 5 semanas. Tras la cosecha se determinó el peso seco de la parte aérea y de la raíz después de su secado en estufa durante 48 h a 70 °C.

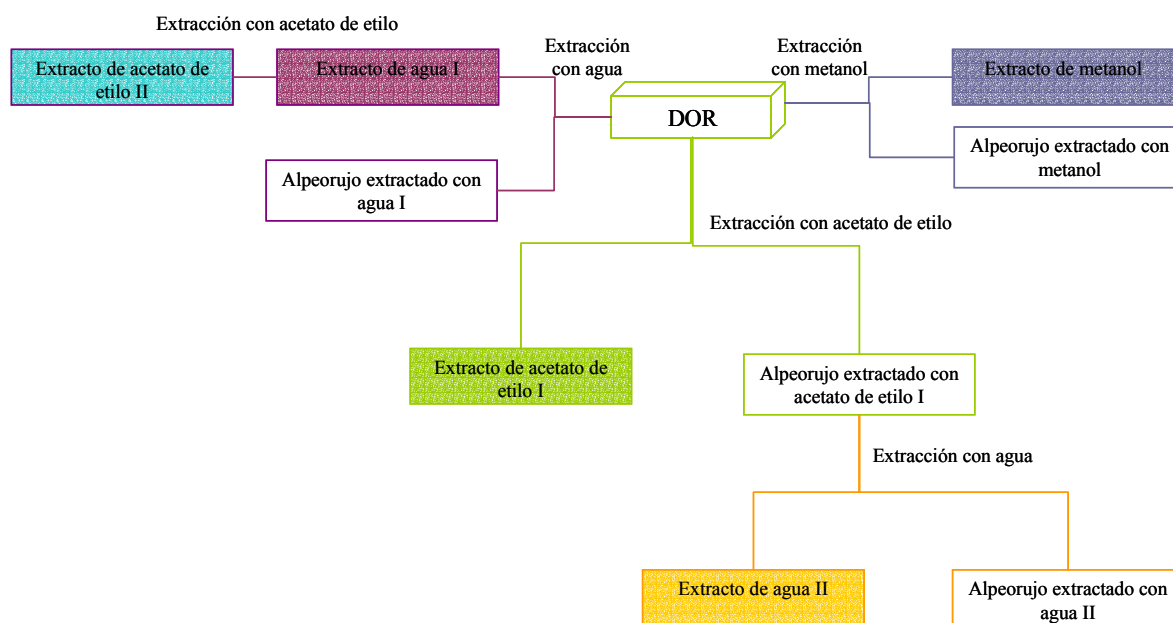
Estudio de los parámetros bioquímicos

A todos los extractos de alpeorujos y alpeorujos extractados inoculados con los hongos saprobios y sus respectivos controles incubados y de acuerdo con la metodología descrita anteriormente en el capítulo general de Material y Métodos se les determinó: biomasa fúngica, contenido fenoles totales, presencia de fenoles simples mediante TLC o HPLC-UV/MS, contenido de azúcares totales, actividades endohidrolíticas (endopolimetilgalacturonasa, endoglucanasa, endoxiloglucanasa) y actividades ligninolíticas (lacasa y manganeso peroxidasa). Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Resultados

3.1.1. Extractos de alpeorujos obtenidos mediante extracción orbital

Esquema 1. Esquema del proceso de extracción del alpeorujos seco y extractado con extractor rotativo orbital.



Fitotoxicidad de los extractos de alpeorujó

Los resultados de la Tabla 1 muestran como el extracto agua I de alpeorujó fue muy tóxico para las semillas de berro pues a las concentraciones usadas en nuestros experimentos el índice de germinabilidad no superó el 45% y además inhibió la germinación de las semillas cuando se aplicó a una proporción de 15% (Tabla 1). El tratamiento con hongos saprobios disminuyó esta fitotoxicidad, de manera que todos los hongos aumentaron el índice de germinabilidad respecto al control a todas las dosis aplicadas salvo *C. rigida* que solo lo hizo a determinadas concentraciones. Es de destacar que el extracto agua I incubado con los hongos y añadido a bajas proporciones no fue fitotóxico para las semillas de berro ya que superaron el 60% de germinabilidad, límite que marca la toxicidad de una sustancia para la planta. El extracto de acetato de etilo I de alpeorujó, aplicado a una proporción de 15%, disminuyó el índice de germinabilidad de semillas de berro en un 89%. Concentraciones de 5 y 2,5% de extracto de acetato de etilo de alpeorujó no fueron fitotóxicas. Los extractos de acetato de etilo inoculado con los hongos seleccionados no redujeron en general la fitotoxicidad del extracto, salvo cuando fue tratado con *T. versicolor* (Tabla 1). El extracto agua II de alpeorujó posee al igual que el extracto agua I marcados efectos fitotóxicos en semillas de berro ya que se obtuvieron porcentajes de germinabilidad inferiores a 65% a proporciones de 15, 10 y 5%. El tratamiento con *C. rigida* y *T. versicolor* incrementó el índice de germinabilidad respecto al control cuando éste se añadió a concentraciones de 15, 10 y 5% mientras que *P. chrysogenum*-10 solo aumentó el índice de germinabilidad cuando se aplicó en una proporción de 15%. Cabe destacar que tras la inoculación del extracto agua II de alpeorujó con *Py. cinnabarinus* no se produjo modificación alguna en el índice de germinabilidad respecto al control. La mayoría de las concentraciones de extracto metanólico utilizadas en este ensayo resultaron ser fitotóxicas para las semillas de berro. Esta fitotoxicidad se redujo cuando el extracto se incubó con *P. chrysogenum*-10, *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* a distintas concentraciones. *Py. cinnabarinus* eliminó la fitotoxicidad del extracto metanólico cuando se aplicó a las concentraciones más bajas y *P. chrysogenum*-10 a concentraciones altas. Por otro lado, *T. versicolor* no produjo ninguna modificación en la fitotoxicidad de este extracto. El extracto de acetato de etilo II resultó fitotóxico a todas las concentraciones aplicadas. Todos los hongos saprobios eliminaron la fitotoxicidad del extracto cuando se añadió a semillas de berro a las proporciones de 5 y 2,5%.

Tabla 1. Índice de germinabilidad (%) de semillas de berro (*L. sativum* L.) en presencia de extracto agua I, acetato de etilo I, agua II, metanol y acetato de etilo II de alpeorujo realizados con extracción orbital sin inocular (Control) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10, *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna para cada extracto indican diferencias significativas según el test de Duncan ($P \geq 0,05$).

Extracto	Tratamiento	Concentración (%)			
		15	10	5	2,5
Agua I	Control	0 a	5,4 a	37,4 a	43,1 a
	<i>P. chrysogenum</i> 10	32,1 bc	45,1 bcd	71,9 bc	78,9 bc
	<i>C. rigida</i>	8,2 a	21,7 bc	40,9 a	77,4 bc
	<i>T. versicolor</i>	48,9 d	65,6 f	68,9 bc	98,4 e
	<i>Py. cinnabarinus</i>	42,9 cd	56,1 ef	82,1 d	87,1 d
Acetato de etilo I	Control	11,3 a	48,9 bc	78,6 a	91,7 a
	<i>P. chrysogenum</i> 10	11,7 a	56,2 cd	82,4 a	107,6 ab
	<i>C. rigida</i>	6,4 a	30,7 ab	84,0 a	101,1 a
	<i>T. versicolor</i>	25,2 b	73,9 d	97,6 b	101,3 a
	<i>Py. cinnabarinus</i>	4,3 a	16,1 a	59,0 a	83,7 a
Agua II	Control	0,4 a	1,6 a	32,4 a	72,91ab
	<i>P. chrysogenum</i> 10	1,8 b	4,4 a	31,5 a	56,9 a
	<i>C. rigida</i>	2,1 b	26,9 c	51,9 b	79,1 ab
	<i>T. versicolor</i>	1,9 b	19,1 c	81,5 c	82,4 a
	<i>Py. cinnabarinus</i>	0,6 a	6,9 ab	46,62 ab	86,8 b
Metanol	Control	8,1 bc	11,8 abc	16,4 ab	61,7 abc
	<i>P. chrysogenum</i> 10	21,6 d	47,4 ef	54,9 cde	86,2 cde
	<i>C. rigida</i>	4,6 abc	27,8 abc	57,7 cde	66,9 bcd
	<i>T. versicolor</i>	2,9 ab	3,7 ab	32,2 abc	50,1 ab
	<i>Py. cinnabarinus</i>	7,9 bcd	9,6 abc	64,1 cde	94,9 def
Acetato de etilo II	Control	6,9 ab	11,1 bc	23,1 a	53,3 abc
	<i>P. chrysogenum</i> 10	14,3 abc	23,5 bc	29,9 b	47,5 a
	<i>C. rigida</i>	20,7 bc	32,1 cd	54,5 c	84,6 d
	<i>T. versicolor</i>	22,5 bc	18,4 ab	46,7 bc	67,2 abc
	<i>Py. cinnabarinus</i>	17,2 abc	1,1 a	35,3 bc	80,5 d

Biomasa fúngica

Todos los hongos utilizados en nuestros experimentos crecieron en los extractos de alpeorujos obtenidos mediante extracción orbital (Tabla 2). El extracto Agua I de alpeorujos fue de forma general donde más crecieron los hongos mientras que el de acetato de etilo fue donde menor desarrollo de estos se detectó. *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* fueron los hongos que más crecieron en la mayoría de los extractos.

Tabla 2. Peso seco del micelio (g) de los hongos cultivados en los extractos de alpeorujos realizados con extracción orbital. Las letras distintas indican diferencias significativas según el test de Duncan ($P \geq 0,05$).

Tratamiento	Agua I	Acetato de etilo I	Agua II	Metanol	Acetato de etilo II
<i>P. chrysogenum-10</i>	0,71 bc	0,20 b	0,37 b	0,77 bc	0,03 a
<i>C. rigida</i>	0,27 b	0,81 c	0,36 b	0,30 b	0,04 a
<i>T. versicolor</i>	1,39 d	0,69 bc	0,33 b	0,89 c	0,46 b
<i>Py. cinnabarinus</i>	1,34 d	0,60 bc	0,90 c	1,19 d	0,10 a

Contenido fenólico

Compuestos fenólicos totales

Los valores del contenido fenólico de los diferentes extractos de alpeorujos fueron 18,45; 2,21; 15,14; 9,5 y 2,65 g/kg de alpeorujos para el extracto agua I, acetato de etilo I, agua II, metanol y acetato de etilo II respectivamente (Fig. 1A, B, C, D y E).

La inoculación de los diferentes extractos con los hongos utilizados en el ensayo disminuyó el contenido fenólico. El descenso de fenoles varió en función del extracto y del hongo utilizado. Así la inoculación del extracto agua I y II de alpeorujos con *P. chrysogenum-10* y *C. rigida* no produjo variación en el contenido fenólico del extracto, sin embargo el resto de los hongos saprobios de la madera redujeron a la mitad aproximadamente el contenido fenólico (Fig. 1A y C). En la Fig. 1B se observa como todos los hongos ensayados salvo *P. chrysogenum-10*, disminuyeron los fenoles del

extracto de acetato de etilo de alpeorujó. En general se observó un descenso superior al 75% del contenido fenólico del extracto, aunque *T. versicolor* alcanzó una reducción del 90%. Todos los hongos disminuyeron los compuestos fenólicos del extracto metanólico observándose descensos entre el 40 y 75% aproximadamente (Fig. 1D). *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* tuvieron efectos similares sobre los fenoles del extracto de acetato de etilo II y sobre el de acetato de etilo I aunque el porcentaje de reducción fenólica fueron inferiores en este último (Fig. 1E).

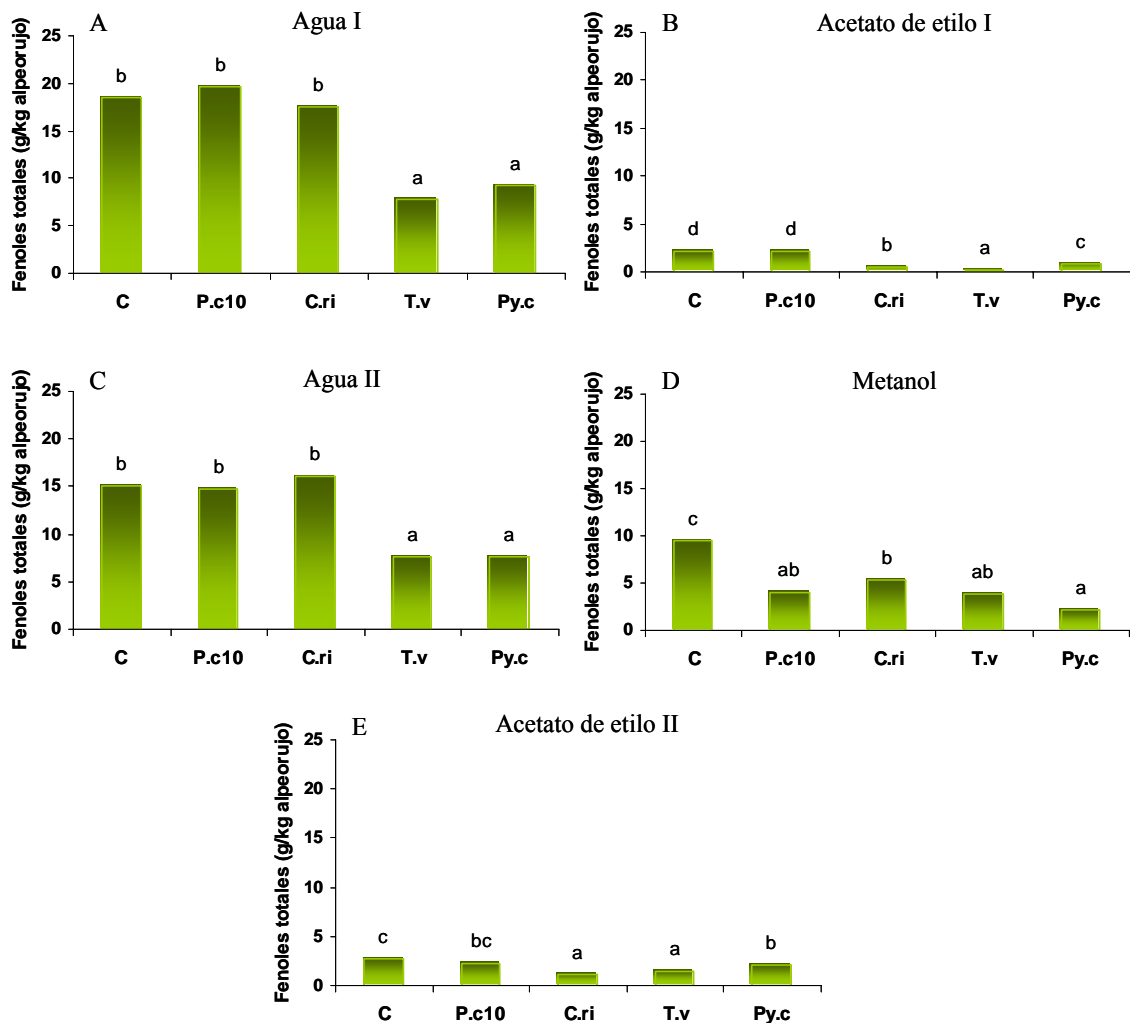


Fig. 1. Contenido fenólico del extracto agua I (A), acetato de etilo I (B) agua II (C), metanol (D) y acetato de etilo II (E) de alpeorujó realizado con extracción orbital sin inocular (C) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10), *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Compuestos fenólicos simples

La determinación cualitativa de fenoles por medio de cromatografía en capa fina permitió la identificación de hidroxitirosol y el p-tirosol en todos los extractos de alpeorujos realizados con extracción orbital. En los extractos agua I y II y acetato de etilo I y II se observaron también otros compuestos fenólicos que no se pudieron identificar mediante esta técnica. La inoculación de los extractos de alpeorujos con los hongos utilizados en este ensayo produjo modificaciones de estos monómeros. *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* eliminaron el hidroxitirosol del extracto agua I pero no modificaron el contenido de p-tirosol mientras que *P. chrysogenum*-10 metabolizó solamente el p-tirosol (Fig. 2A). *C. rigida* no modificó el contenido de fenoles detectados en el extracto agua I mediante TLC. En el extracto de acetato de etilo I de alpeorujos los hongos *C. rigida* y *T. versicolor* eliminaron hidroxitirosol y p-tirosol mientras que *Py. cinnabarinus* solo eliminó el p-tirosol. *P. chrysogenum*-10 no pudo metabolizar estos monómeros fenólicos (Fig. 2B). Todos los hongos utilizados eliminaron el hidroxitirosol en el extracto agua II de alpeorujos mientras que solo *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* degradaron p-tirosol (Fig. 2C). En el extracto metanol de alpeorujos *Py. cinnabarinus* fue el único hongo capaz de degradar los dos fenoles detectados (Fig. 2D). Se ha observado mediante TLC que el extracto de acetato de etilo II tratado con los hongos saprobios no modificó en ningún caso la presencia de dichos fenoles (Fig. 2E). Los compuestos fenólicos no identificados no se modificaron tras la incubación de los extractos.

El análisis de la composición fenólica del extracto de acetato de etilo de alpeorujos mediante HPLC y espectrometría de masas dio como resultado la identificación de 9 compuestos (Fig. 3). Los fenoles identificados enumerados en función de su tiempo de retención fueron: ácido protocatecuico, hidroxitirosol, protocatecol, p-tirosol, ácido vainílico, ácido p-cumárico, monoacetil hidroxitirosol y oleuropeína. El compuesto número 6 está pendiente de su identificación. La cuantificación realizada mediante el análisis de espectrometría de masas mostró que el compuesto más abundante en los extractos de acetato de etilo de alpeorujos fue el hidroxitirosol seguido del ácido protocatecuico y la oleuropeína. La estructura, masa molecular y tiempo de retención de los fenoles identificados en el extracto de acetato de etilo de alpeorujos se detallan en la Tabla 3.

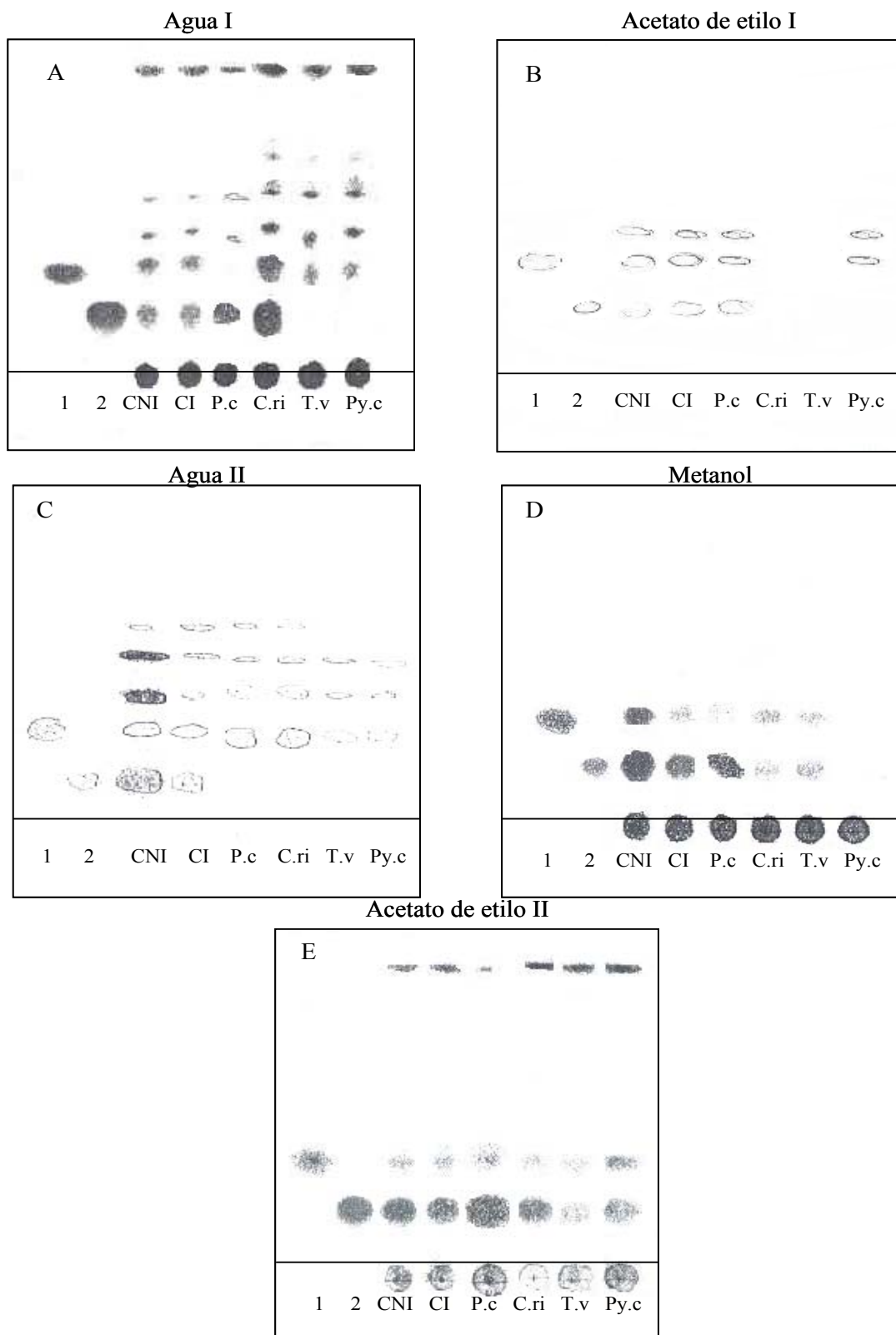


Fig. 2. Contenido fenólico detectado mediante TLC del extracto agua I (A), acetato de etilo I (B), agua II (C), metanol (D) y acetato de etilo II (E) de alpeorujos realizados con extracción orbital sin incubar (CNI), incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c), *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Estándares: p-tirosol (1) hidroxitirosol (2).

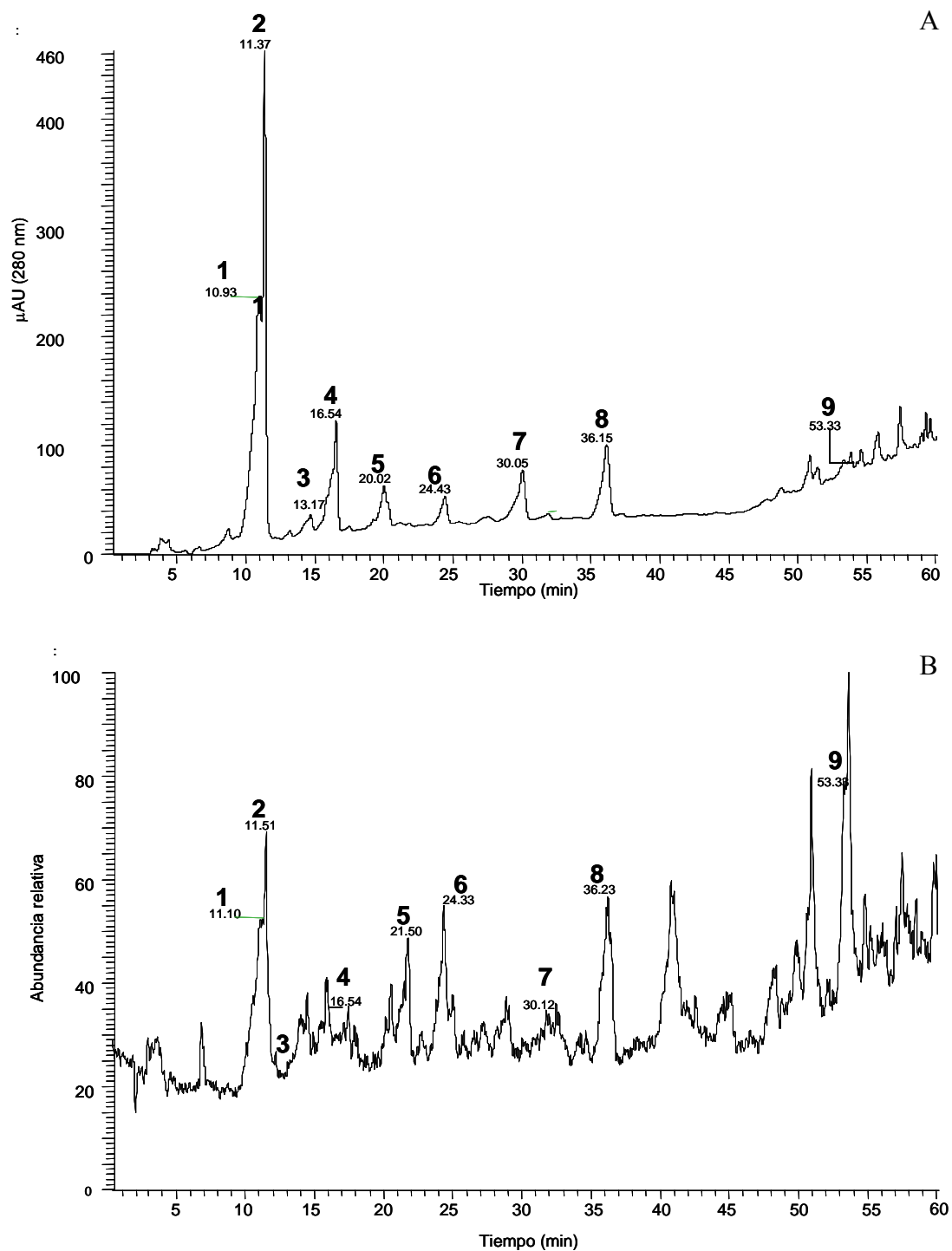
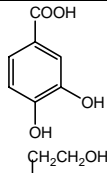
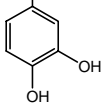
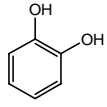
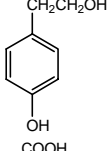
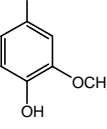
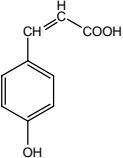
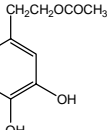
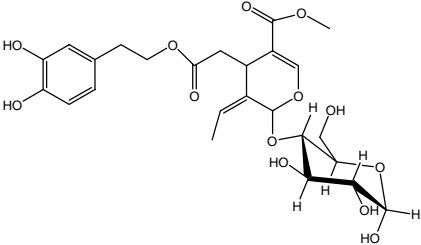


Fig. 3. Cromatograma HPLC (A) y LC-MS (B) de extracto de acetato de etilo de alpeorajo obtenido mediante extracción orbital. Picos: (1) ácido protocatecuico, (2) hidroxitirosol, (3) protocatecol, (4) tirosol, (5) ácido vainílico, (6) compuesto no identificado, (7) ácido p-cumárico, (8) monoacetil-hidroxitirosol y (9) oleuropeina.

Tabla 3. Nombre común, estructura química, masa molecular y tiempo de retención de los fenoles identificados en el extracto de acetato de etilo de alpeorujo.

Número	Nombre común	Estructura química	Masa molecular	t _r
1	Ácido protocatecuico		154.12	10.93
2	Hidroxitirosol		154.16	11.37
3	Protocatecol		110.11	13.17
4	Tirosol		138.16	16.54
5	Ácido vainílico		168.15	20.02
6	---	---	216.14	24.43
7	Ácido <i>p</i> -cumárico		164.16	30.05
8	Monoacetil hidroxitirosol		196.16	36.15
9	Oleuropeina		540.51	53.33

Contenido en azúcares totales

El contenido en azúcares totales detectado en los extractos de alpeorujó fue de 91,73; 1,27; 64,7; 73,9 y 0,35 mg/g de alpeorujó en los extractos agua I, acetato de etilo I, agua II, metanol y acetato de etilo II respectivamente (Fig. 4).

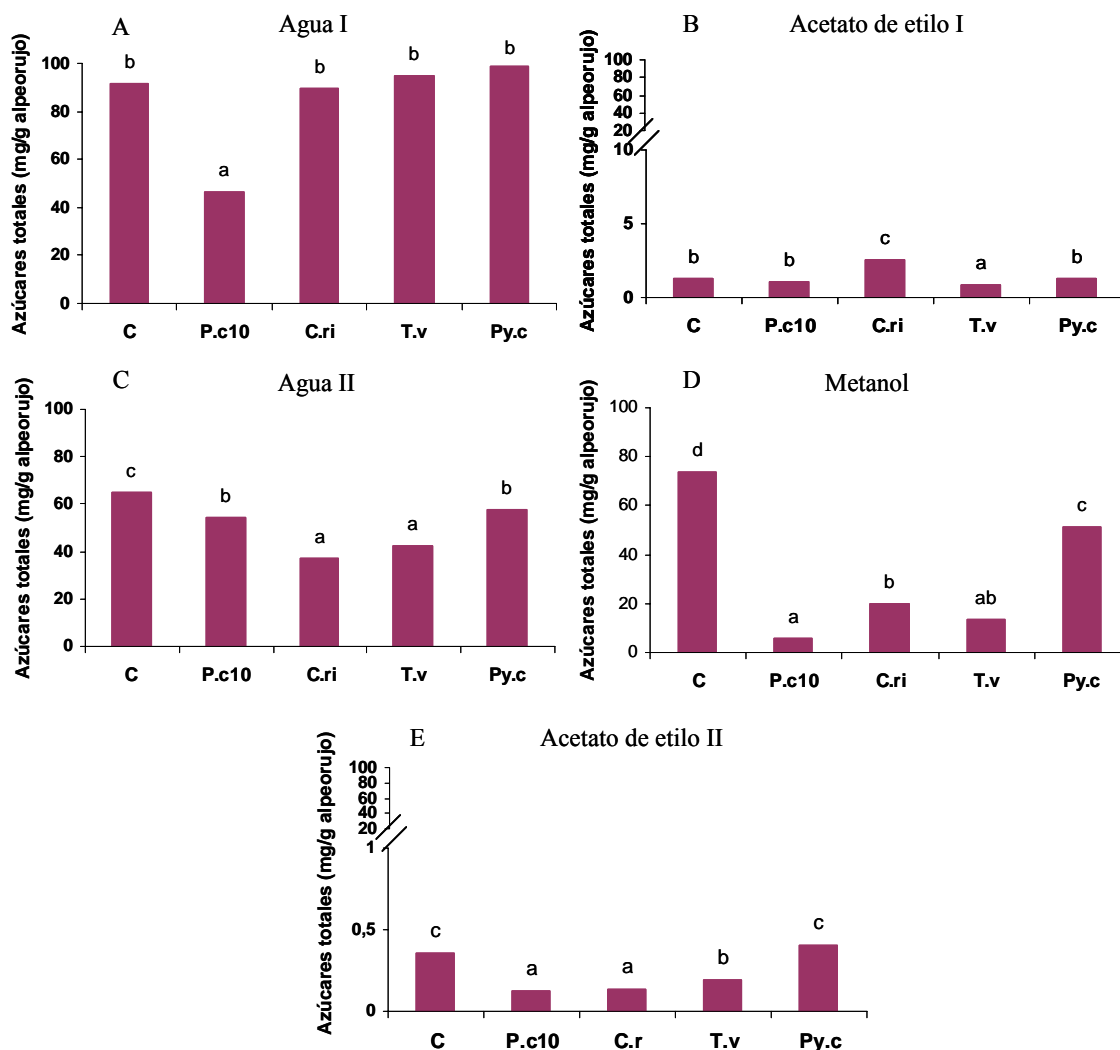


Fig. 4. Contenido en azúcares totales del extracto agua I (A), acetato de etilo I (B), agua II (C), metanol (D) y acetato de etilo II (E) de alpeorujó realizado con extracción orbital, sin inocular (C) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10), *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Las inoculación del extracto agua I de alpeorujó con los hongos ligninolíticos no produjeron modificaciones en el contenido de azúcares, sin embargo, el hongo saprobio del suelo *P. chrysogenum*-10, disminuyó la cantidad de azúcares un 50% respecto al extracto no inoculado (Fig. 4A). Aunque el extracto de acetato de etilo I de alpeorujó presenta una cantidad muy baja en azúcares se ha observado que tras la inoculación de este con *T. versicolor* descendió el contenido de estas en un 30% tal y como se observa en la Fig. 4B. En general todos los hongos disminuyeron el contenido en azúcares totales del extracto agua II. Cabe destacar el efecto de *C. rigida* y *T. versicolor* que eliminaron el 42 y 65% de azúcares respectivamente (Fig. 4C). El contenido en azúcares totales del extracto metanólico de alpeorujó se redujo tras la incubación de todos los hongos estudiados llegando *P. chrysogenum*-10 a reducir el 90% de estos (Fig. 4D). Tal y como puede observarse en la Fig. 4E todos los hongos seleccionados salvo *Py. cinnabarinus* usaron como fuente carbonada los azúcares extraídos en el extracto de acetato de etilo II disminuyendo el contenido inicial a valores entre el 45 y 65%.

Actividades endohidrolíticas

En todos los extractos de alpeorujó incubados con los hongos saprobios objeto de estudio se detectaron actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG), aunque los niveles de producción de estos enzimas hidrolíticos fueron variables para cada uno de los extractos de alpeorujó Fig. 5).

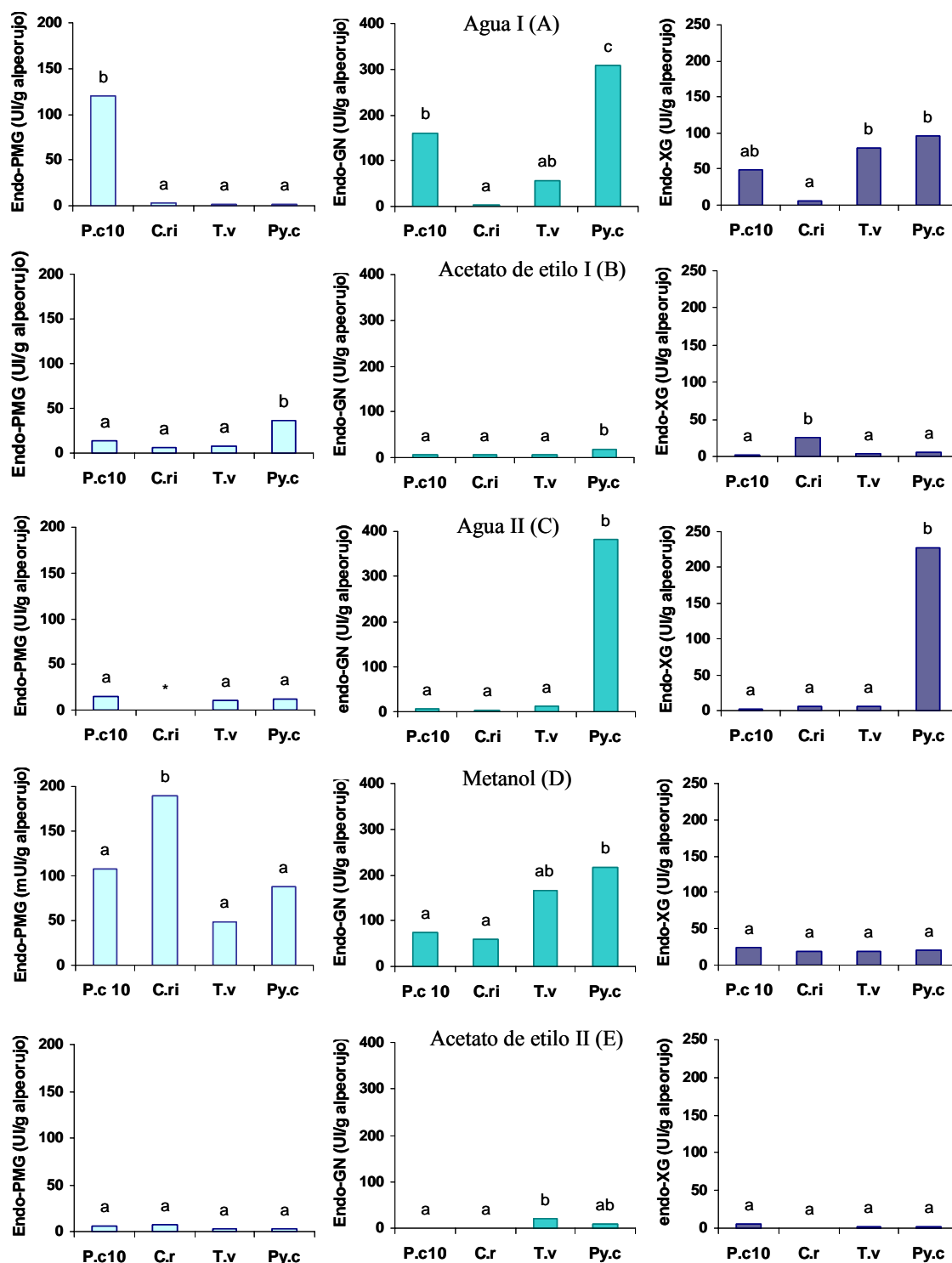


Fig. 5. Actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN), y endoxiloglucanasa (endo-XG) detectada en el extracto agua I (A), acetato de etilo I (B), agua II (C), metanol (D) y acetato de etilo II (E) de alpeorujjo realizado con extracción orbital inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10), *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto de alpeorujjo y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

La actividad endo-PMG en el extracto agua I de alpeorujó fue muy baja y solo se observó actividad de una forma más notoria tras su inoculación con *P. chrysogenum*-10 (Fig 5A). En este extracto se observó en general actividad endo-GN y endo-XG con todos los hongos saprobios aunque las que produjo *C. rigida* fueron bajas. Tal y como se observa en las Fig. 5B y E las actividades endo-PMG, endo-GN y endo-XG detectadas en los extractos de acetato de etilo I y II de alpeorujó inoculados con los hongos fueron muy bajas. La incubación del extracto agua II con la mayoría de los hongos saprobios mostró también valores muy bajos de todas las actividades endohidrolíticas llegando incluso a no detectarse actividad endo-PMG tras la incubación con *C. rigida*. Estos extractos, inoculados con *Py. cinnabarinus*, fueron los únicos que tuvieron actividades endo-GN y endo-XG considerables llegando a alcanzar 380 y 225 UI/g de alpeorujó respectivamente (Fig. 5C). La actividad endo-PMG en extractos metanólicos de alpeorujó inoculados con los hongos saprobios fue elevada alcanzando cerca de las 200 UI/g de alpeorujó tras la inoculación con *C. rigida*. *Py. cinnabarinus* mostró valores de actividad endo-GN cercanos a 225 UI/g de alpeorujó. La actividad endoxiloglucanasa en este extracto fue similar en todos los hongos ensayados (Fig. 5D).

Actividades ligninolíticas

Tras la incubación de los extractos de alpeorujó con los diferentes hongos saprobios se detectó actividad lacasa y Mn peroxidasa aunque los niveles fueron diferentes entre los distintos extractos y los diferentes hongos (Fig. 6). Los valores de actividad lacasa detectados en los extractos agua I y II inoculados con *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* fueron entre 600 y 1600 mUI/g de alpeorujó mientras que en los demás extractos estas actividades no superaron los 100 mUI/g de alpeorujó. En los extractos agua I y II, *P. chrysogenum*-10 y *C. rigida* no produjeron niveles considerables de esta actividad (Fig. 6A y C). Los extractos metanol y acetato de etilo II mostraron un comportamiento similar en cuanto a la producción de actividad lacasa se refiere, mostrando solo niveles considerables de esta actividad tras la incubación con *Py. cinnabarinus* (Fig. 6D y E). El extracto de acetato de etilo I tuvo una actividad lacasa de 80 mUI/g de alpeorujó cuando se incubó con *C. rigida* mientras que en el caso de *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* las actividades fueron mas pequeñas (Fig. 6B).

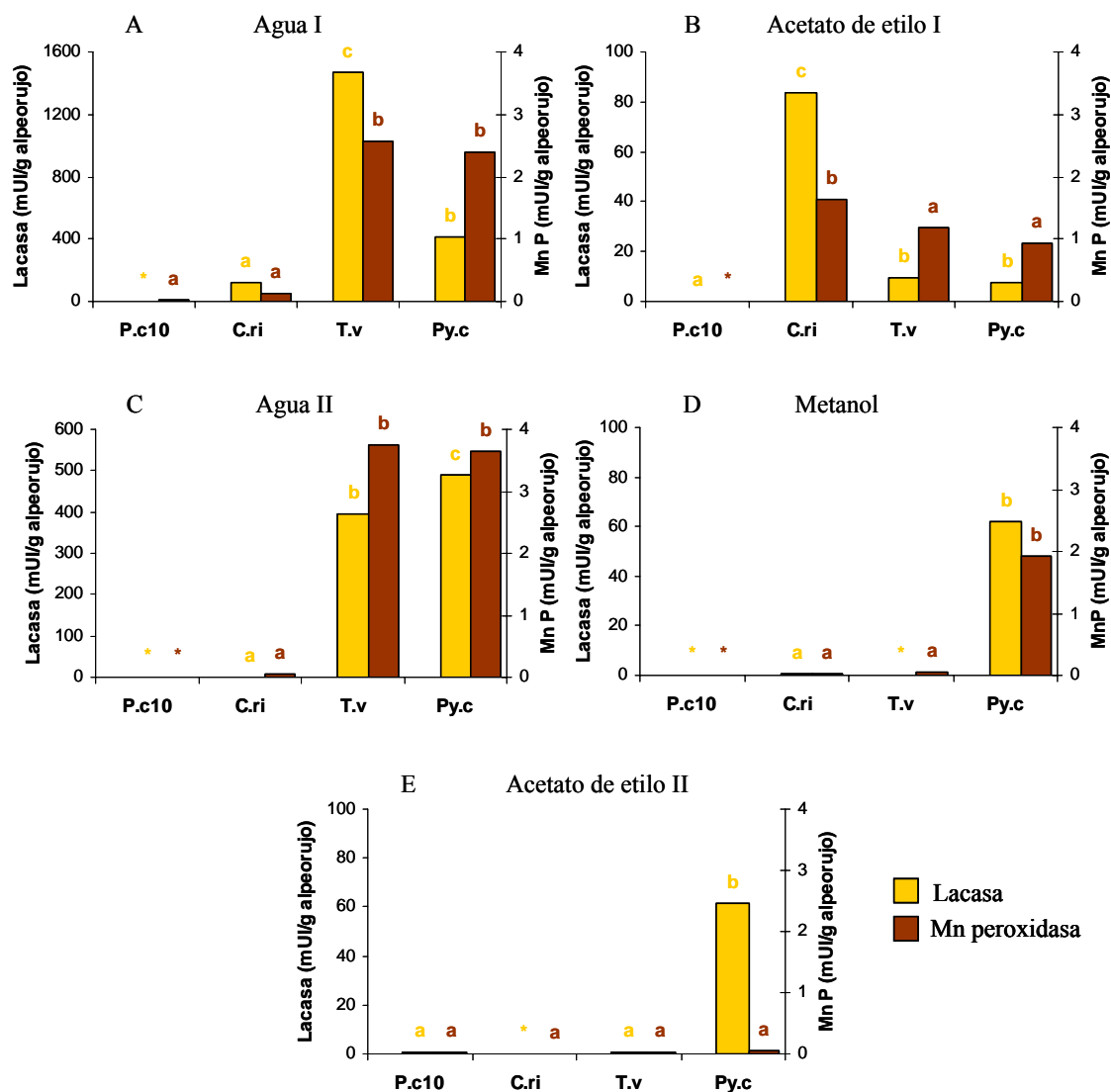


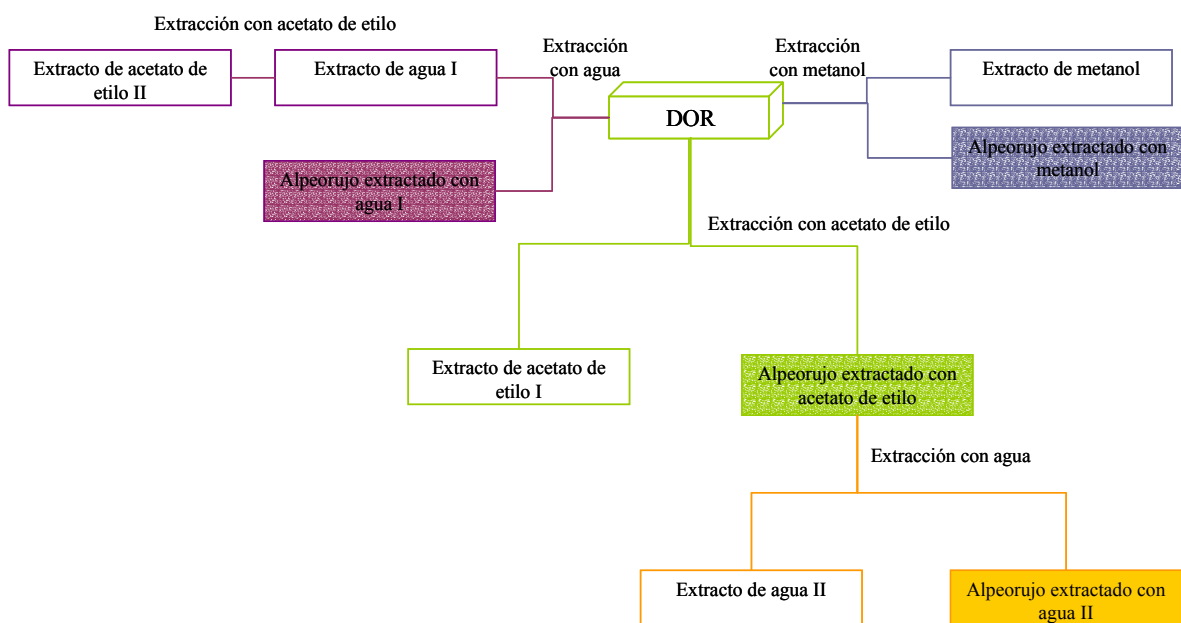
Fig. 6. Actividad lacasa y Mn peroxidasa detectada en el extracto agua I (A), acetato de etilo I (B), agua II (C), metanol (D) y acetato de etilo II (E) de alpeorujos realizados con extracción orbital inoculados con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10), *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto de alpeorujos y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

Los mayores valores de actividad Mn peroxidasa se obtuvieron en los extractos agua I y II inoculados con *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*, principalmente en este último extracto donde alcanzaron valores entre 3,5 y 4 mUI/g de alpeorujos respectivamente. En ambos extractos *P. chrysogenum*-10 y *C. rigida* tuvieron una actividad Mn peroxidasa muy baja o nula (Fig. 6A y C). En el extracto de acetato de etilo I fue el único donde se detectó actividad Mn peroxidasa considerable después de la

inoculación con todos los hongos seleccionados salvo con *P. chrysogenum*-10 (Fig. 6B). En el extracto metanol tan solo *Py. cinnabarinus* mostró actividad Mn peroxidasa (Fig. 6D). Cabe destacar que no se detectó actividad Mn peroxidasa por ninguno de los hongos ensayados en el extracto de acetato de etilo II de alpeorujos (Fig. 6E).

3.1.2. Alpeorujos extractados mediante extractor rotativo orbital

Esquema 2. Esquema del proceso de extracción del alpeorujos seco y extractado con extractor rotativo orbital.



Fitotoxicidad de los alpeorujos extractados

Los alpeorujos extractados agua I, acetato de etilo, agua II y metanol (Esquema 2) resultaron tóxicos para las plantas de tomate ya que en la mayoría de los casos redujeron un 50% del peso seco de la parte aérea cuando se aplicaron a dosis bajas y entre 60 y 80% a dosis altas (Tabla 4). Los alpeorujos extractados con acetato de etilo y agua II, a altas concentraciones, fueron los residuos más tóxicos para la parte aérea de las plantas de tomate. Tras la inoculación con los hongos saprobios se observó en algunos casos un aumento en el peso seco de la parte aérea respecto a su control no tratado, no llegando en ningún caso a superar el peso de las plantas control de tomate sin alpeorujos. El alpeorujos extractado con agua I y II e inoculado con *Py. cinnabarinus* aumentó el peso

Capítulo III

seco de la parte aérea de las plantas de tomate alcanzando un valor similar al control. En el alpeorajo extractado con acetato de etilo, solo *P. chrysogenum*-10 fue capaz de eliminar la fitotoxicidad del residuo para la parte aérea de tomate. El alpeorajo extractado con metanol fue el único residuo en el que los dos hongos utilizados en nuestros ensayos eliminaron la fitotoxicidad inicial llegando a duplicar el peso seco de la parte aérea de las plantas de tomate cuando se utilizó la menor dosis. El peso seco de la raíz no mostró variaciones significativas tras la aplicación del alpeorajo extractado no incubado o incubado con los hongos saprobios a ninguna de las dosis utilizadas.

Tabla 4. Peso seco de la parte aérea y raíz (mg) de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas sin alpeorajo (Co) y en presencia de alpeorajo extractado con agua I, acetato de etilo, agua II y metanol realizado con extracción orbital, incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos *P. chrysogenum*-10 (P.c10) y *Py. cinnabarinus* (Py.c) a distintas concentraciones. Letras distintas en cada columna para cada alpeorajo extractado y parte de la planta denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($P \geq 0,05$).

Parte aérea		Agua I	Acetato de etilo	Agua II	Metanol
Co		240,0 cd	242,0 c	240,0 c	241,0 c
CI	2,5%	130,0 ab	110,0 ab	125,0 b	80,0 a
	5%	93,3 a	53,3 a	66,7 a	90,0 a
Pc.10	2,5%	180,0 bc	200,0 c	136,7 b	156,7 b
	5%	150,0 ab	175,0 bc	113,3 ab	230,0 c
Py.c	2,5%	253,3 c	175,0 bc	180,0 bc	150,0 b
	5%	120,0 ab	93,3 a	146,6 b	123,3 ab
Raíz		Agua I	Acetato de etilo	Agua II	Metanol
Co		43,3 a	42,0 b	43,5 a	42,7 a
CI	2,5%	36,7 a	20,0 ab	23,3 a	23,3 a
	5%	26,7 a	19,0 ab	20,0 a	16,7 a
Pc.10	2,5%	36,6 a	36,7 ab	26,7 a	33,3 a
	5%	30,0 a	20,0 ab	26,7 a	26,7 a
Py.c	2,5%	43,4 a	16,7 ab	33,4 a	33,4 a
	5%	20,0 a	10,0 a	30,0 a	20,0 a

Contenido fenólico

El mayor contenido fenólico de los alpeorujos extractados con los distintos solventes fue el del alpeorujos extractados con acetato de etilo (22 g/kg de alpeorujos) al que le siguió el de metanol (16 g/kg de alpeorujos), agua I (14 g/kg de alpeorujos) y por último el agua II (8,36 g/kg de alpeorujos) (Fig. 7). Este contenido disminuyó tras el proceso de incubación de los alpeorujos extractados con acetato de etilo y metanol mientras que en el resto de los casos la incubación no los modificó. La inoculación de los alpeorujos extractados con los hongos *P. chrysogenum*-10 y *Py. cinnabarinus* disminuyó la cantidad de fenoles significativamente variando según el alpeorujos extractado desde un 50% a un 80%. En todos los alpeorujos estudiados el comportamiento de los hongos fue similar salvo en el alpeorujos extractado con metanol donde *Py. cinnabarinus* no produjo modificación alguna de su contenido fenólico (Fig. 7).

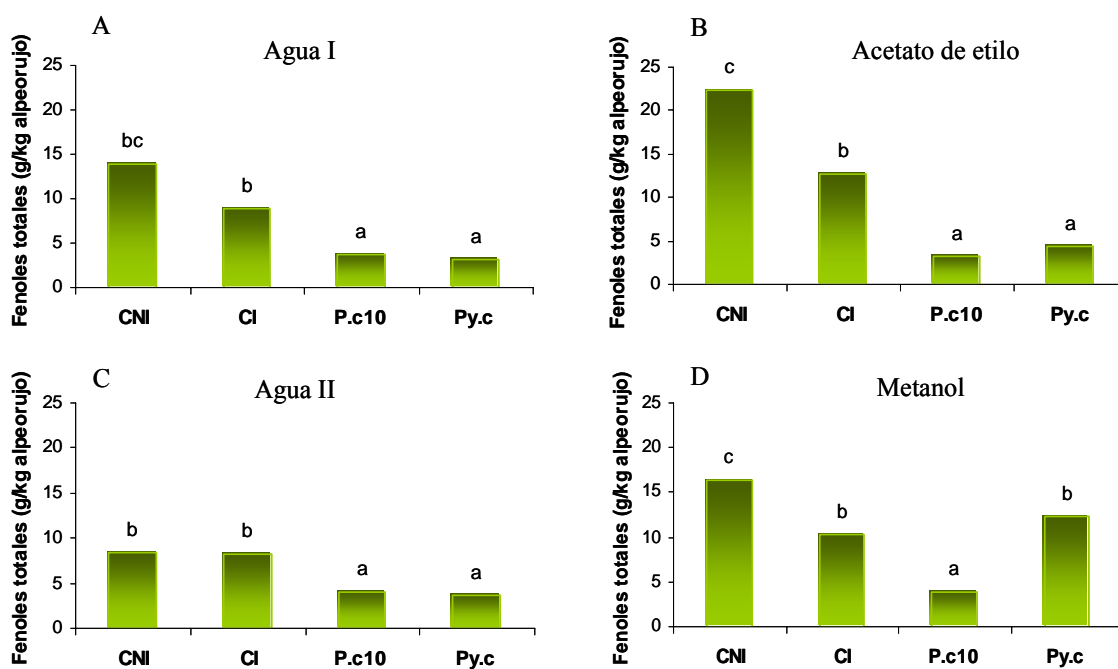


Fig. 7. Contenido fenólico del alpeorujos extractado con agua I (A), acetato de etilo (B), agua II (C) y metanol (D) realizado con extracción orbital sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum* (P.c10) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada uno de los alpeorujos extractados indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Contenido en azúcares totales

El contenido en azúcares totales del alpeorujó extractado con agua I, acetato de etilo, agua II y metanol fue respectivamente de 40, 80, 13 y 49 mg/g de alpeorujó (Fig. 8). Pudimos observar que la incubación del extracto metanol provocó una disminución del contenido de azúcares de dicho extracto. El biotratamiento de los alpeorujos extractados con los diferentes solventes provocó una elevada reducción del contenido de azúcares del orden del 80 y 90% en la mayoría de los casos salvo tras la inoculación con *Py. cinnabarinus* del alpeorujó extractado con metanol en el que solo se redujo un 20% de dicho contenido.

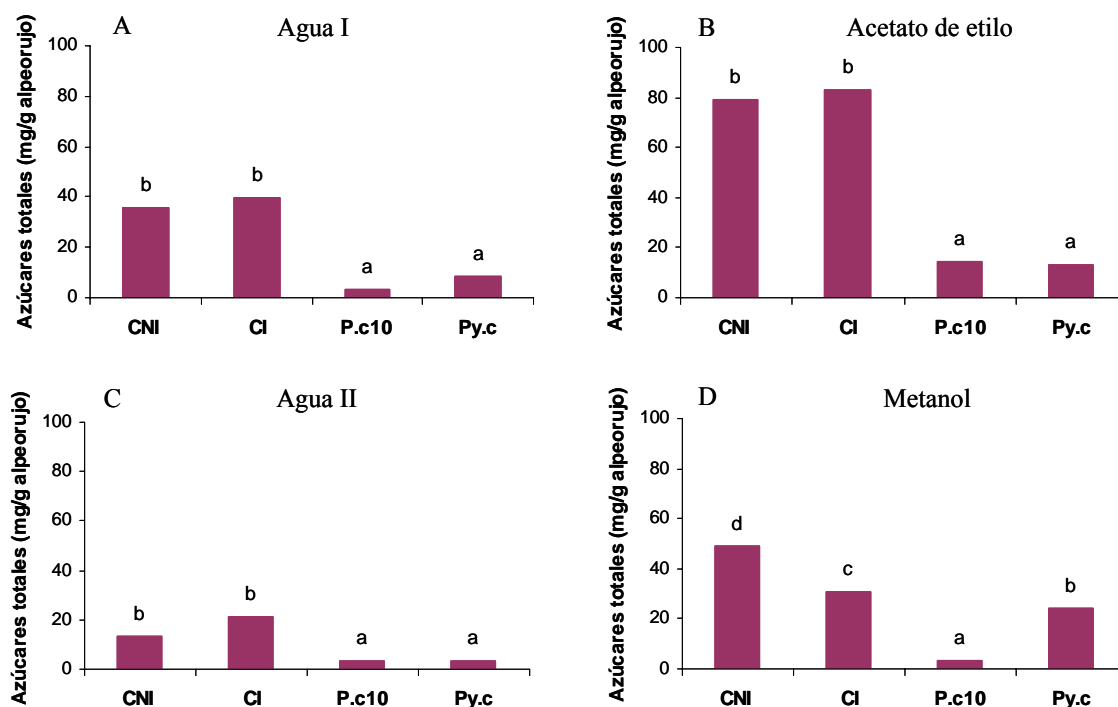


Fig. 8. Contenido en azúcares totales del alpeorujó extractado con agua I (A), acetato de etilo (B), agua II (C) y metanol (D) realizado con extracción orbital sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada uno de los alpeorujos extractados indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Actividades endohidrolíticas

No se detectó actividad endo-PMG en el alpeorujó extractado con los diferentes solventes, salvo en el caso del alpeorujó extractado con metanol donde sí se detectaron actividades aunque con valores muy bajos (10 UI/g de alpeorujó) (Fig. 9A, B, C y D). La actividad endo-GN en los alpeorujos extractados fué muy alta (2000 y 5000 UI/g de alpeorujó). Todos los hongos produjeron niveles similares de actividad endo-GN salvo en el extracto de acetato de etilo donde *P. chrysogenum*-10 produjo niveles muy superiores a los de *Py. cinnabarinus*. *P. chrysogenum*-10 y *Py. cinnabarinus* produjeron unos niveles elevados de actividad endo-XG en todos los alpeorujos extractados. *Py. cinnabarinus* tuvo una actividad endo-XG superior en alpeorujó extractado con agua I mientras que en el extractado con acetato de etilo y agua II fué *P. chrysogenum*-10 el que produjo los mayores valores. Ambos hongos produjeron niveles similares de actividad endo-XG en el alpeorujó extractado con metanol.

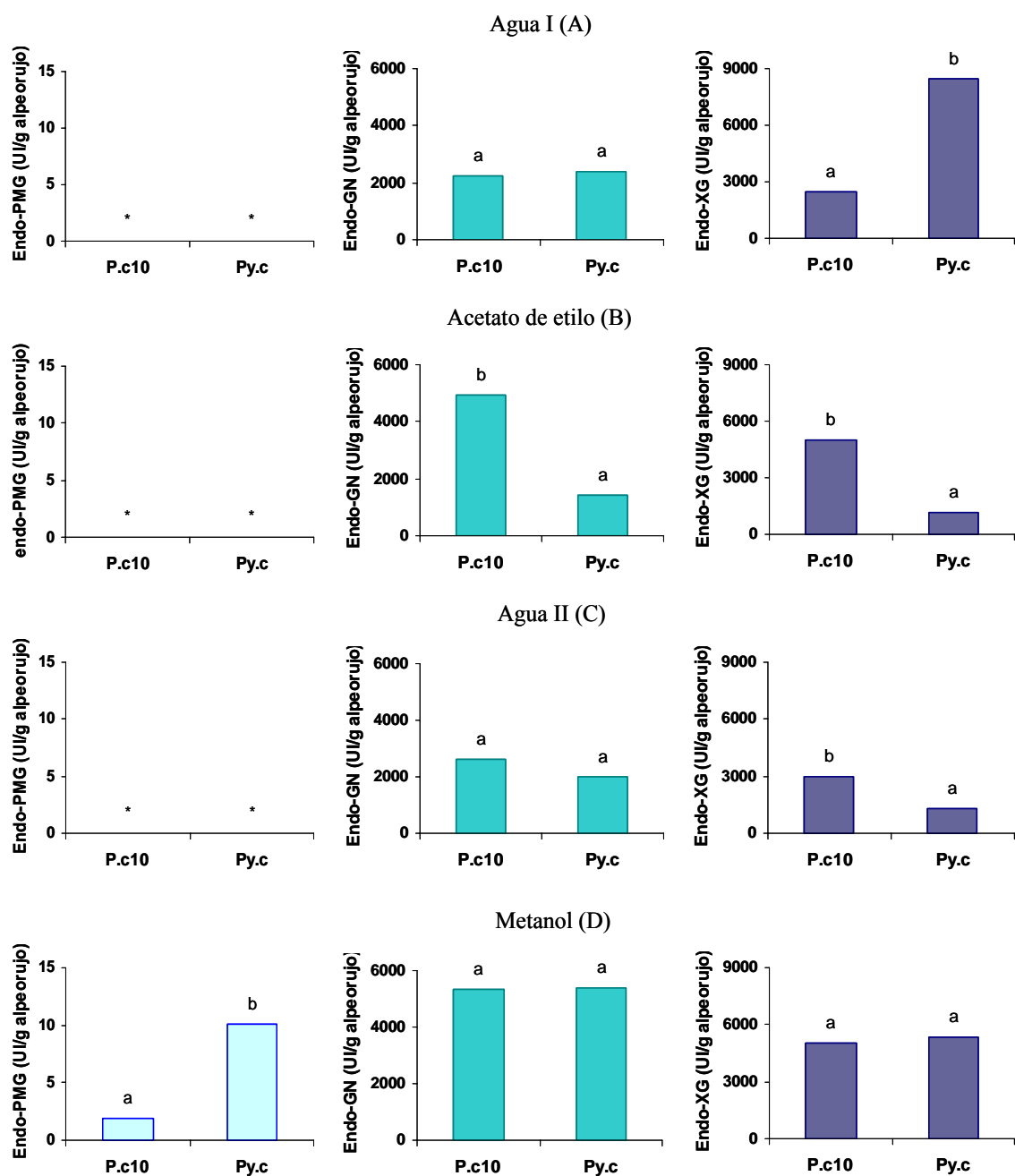


Fig. 9. Actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG) detectada en el alpeorujos extractado con agua I (A), acetato de etilo (B), agua II (C) y metanol (D) realizado con extracción orbital inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada alpeorujos extractado y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

Actividades ligninolíticas

Se detectó actividad lacasa y Mn peroxidasa en todos los alpeorujos extractados con diferentes solventes e inoculados con los hongos saprobios objeto de estudio salvo en el caso de la actividad lacasa con el alpeorujo extractado con acetato de etilo e inoculado con *P. chrysogenum*-10 (Fig. 11B). La máxima actividad lacasa se observó en alpeorujo extractado con agua I e incubado con *Py. cinnabarinus* donde se alcanzaron valores cercanos a las 400 mUI/g de alpeorujo (Fig. 10A). La actividad Mn peroxidasa fue máxima en el alpeorujo extractado con acetato de etilo y metanol (Fig. 10B y D). La inoculación con *P. chrysogenum*-10 de los alpeorujos extractados con agua I y metanol produjo más actividad Mn peroxidasa que la observada con *Py. cinnabarinus*. En los alpeorujos extractados con agua II y acetato de etilo los dos hongos produjeron niveles similares de dicha actividad. En general los valores detectados en los alpeorujos extractados con diferentes solventes de actividad lacasa fueron mucho más bajos que los de Mn peroxidasa.

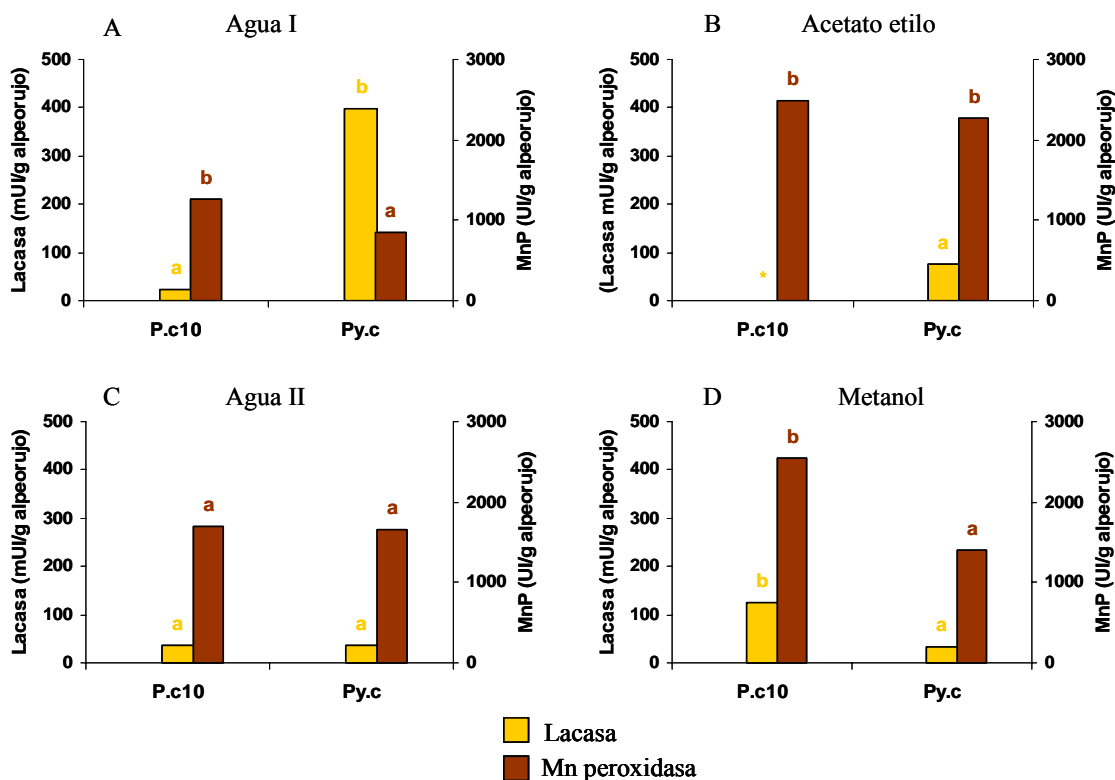


Fig. 10. Actividad lacasa y Mn peroxidasa detectada en el alpeorujo extractado con agua I (A), acetato de etilo (B), agua II (C) y metanol (D) realizado con extracción orbital inoculado con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 (P.c10) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada alpeorujo extractado y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

3.2. Extracción mediante soxhlet

Materiales y métodos

Se seleccionaron tres hongos ligninolíticos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* para la realización de estos ensayos. Estos hongos se inocularon en los diferentes extractos obtenidos mediante extracción con soxhlet y en los respectivos alpeorujos extractados. Los extractos de alpeorujo se incubaron durante 15 días inoculando un homogeneizado de micelio fúngico obtenido de un cultivo de los respectivos hongos. Los alpeorujos extractados se incubaron durante 20 semanas con 6 granos de cebada donde se habían cultivado los hongos objeto de estudio. Ambas incubaciones se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo general de Materiales y Métodos.

Análisis de fitotoxicidad

Ensayos de fitotoxicidad de extractos de alpeorujo

Se tuvieron en cuenta seis factores de variación según los extractos de alpeorujo: extracto de acetato de etilo, n-propanol, metanol, agua I, agua II y agua III (Esquema 3). Cada factor se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera, el factor inoculación de los extractos de alpeorujo con hongos saprobios que contenía cinco tratamientos: control con extracto de alpeorujo sin incubar (CNI) e inoculado sin hongo (CI) o con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. La segunda variable consistió en la proporción de extracto añadido a las semillas: 100, 80, 40, 20, 10 y 5%. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Se realizó el ensayo de germinabilidad de Zucconi modificado en semillas de berro de jardín (*L. sativum* L.) para determinar la fitotoxicidad de los extractos obtenidos con el fraccionamiento mediante extracción en soxhlet.

Las placas Petri con las semillas se dejaron en estufa a 28 °C durante 48 h y transcurrido este tiempo se contabilizó el número de semillas germinadas por placa y la longitud de la radícula.

Ensayos de fitotoxicidad del alpeorujos extractado

Para estos ensayos se tuvieron en cuenta dos factores de variación. El primero consistió en los alpeorujos extractados con los diferentes solventes: acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua I (Esquema 4). El segundo, el factor aplicación de diferentes concentraciones de alpeorujos: 4, 3,5 y 3%.

La fitotoxicidad del alpeorujos extractado con distintos solventes en soxhlet se realizó mediante el ensayo de germinabilidad de Zucconi modificado, en semillas de berro de jardín (*L. sativum* L.).

Se utilizó vermiculita como control y se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Las placas con las semillas se incubaron en estufa durante 72 h y transcurrido este tiempo se contabilizó el número de semillas germinadas por placa y la longitud de la radícula.

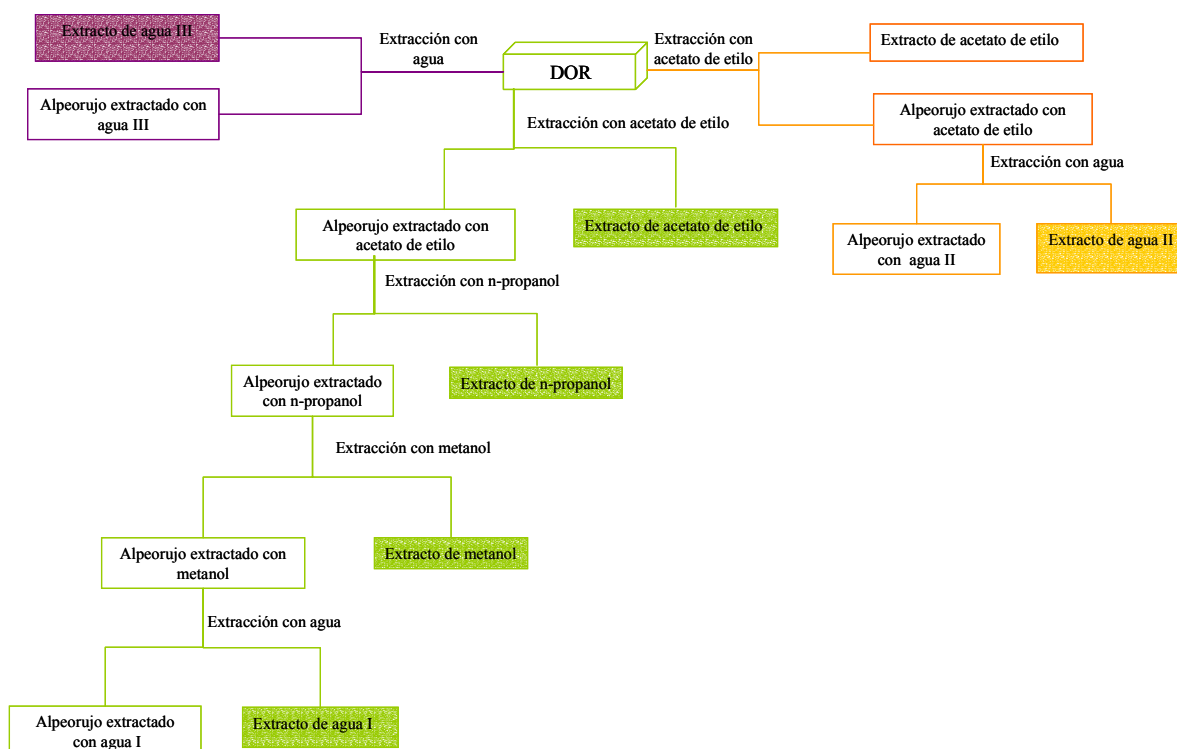
Estudio de los parámetros bioquímicos

A todos los extractos de alpeorujos y alpeorujos extractados incubados con los hongos saprobios y sus respectivos controles incubados y de acuerdo con la metodología descrita en el apartado general de Material y Métodos se les determinó: biomasa fúngica, contenido fenoles totales, presencia de fenoles simples mediante HPLC-UV/MS, contenido de azúcares totales, actividades endohidrolíticas (endopolimetilgalacturonasa, endoglucanasa, endoxiloglucanasa) y actividades ligninolíticas (lacasa y manganeso peroxidasa). Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Resultados

3.2.1. Extractos de alpeorujos obtenidos mediante soxhlet

Esquema 3. Esquema del proceso de extracción del alpeorujos seco y extractado con soxhlet.



Fitotoxicidad de los extractos de alpeorujos

El extracto de acetato de etilo de alpeorujos obtenido mediante soxhlet presentó marcados efectos fitotóxicos en casi todas las concentraciones utilizadas (Tabla 5). A las concentraciones de 100 y 80% se pone de manifiesto una mayor fitotoxicidad del extracto de acetato de etilo tras el proceso de esterilización e incubación sin hongo, efecto que no aparece cuando se aumenta la concentración de dicho extracto. En ningún caso el extracto de acetato de etilo presentó un efecto fertilizante a las dosis aplicadas aunque si se detectó una pérdida de fitotoxicidad tras el tratamiento de dicho extracto con los hongos saprobios. Se observó que tras la incubación del extracto con *C. rigida* se disminuye la fitotoxicidad a todas las dosis aplicadas. El extracto de acetato de etilo inoculado con *T. versicolor* aplicado a semillas de berro aumentó el índice

germinabilidad respecto a su control a concentraciones pequeñas mientras que el tratamiento de este con *Py. cinnabarinus* aumentó el índice de germinabilidad respecto a su control solo a altas concentraciones.

Los estudios de fitotoxicidad del extracto de n-propanol muestran que dicho extracto presenta efectos fitotóxicos ya que inhibe la germinación de las semillas de berro a todas las concentraciones utilizadas (Tabla 5). Tras la inoculación del extracto propanólico con *C. rigida* y *T. versicolor* se observa disminución de la fitotoxicidad respecto a sus controles, a todas las concentraciones utilizadas. Cuando este extracto se inoculó con *T. versicolor* se observó un efecto potenciador de la germinación a dosis de 5%. *Py. cinnabarinus* no produjo ningún cambio en la toxicidad del extracto de n-propanol.

El extracto metanólico tuvo menor fitotoxicidad que los extractos de acetato de etilo y n-propanol de alpeorujos descritos previamente ya que este solo se consideró fitotóxico a proporciones de 100 y 80% (Tabla 5). En este extracto también se observó mayor fitotoxicidad en el extracto incubado que en el no incubado a concentraciones altas. La incubación del extracto metanólico con los hongos *C. rigida* y *T. versicolor* a concentraciones desde 20 a 100% incrementó la germinabilidad de semillas de berro, aunque en ningún caso superó los valores de los controles. En concentraciones de 10 y 5% se observó un efecto potenciador del crecimiento tanto en los controles como en los tratamientos inoculados con *C. rigida* y *T. versicolor*.

Tras la extracción acuosa del alpeorujos extractado secuencialmente con acetato de etilo, n-propanol y metanol se obtuvo un extracto (Agua I) que mostró toxicidad solamente a concentraciones altas del mismo (Tabla 5). La aplicación de dichos extractos inoculados con *C. rigida* a semillas de berro disminuyó notablemente la toxicidad en todas las dosis aplicadas, llegando incluso a superar los controles. Al igual que el extracto de metanol, la inoculación del extracto agua I con los hongos produjo un efecto fertilizante a algunas dosis. El tratamiento de este extracto con *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* no produjo modificaciones en la fitotoxicidad del extracto.

Capítulo III

Tabla 5. Índice de germinabilidad (%) de semillas de berro (*L. sativum* L.) en presencia de extracto de acetato de etilo, n-propanol, metanol, agua I, agua II y agua III de alpeorujo realizado con soxhlet sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna para cada extracto indican diferencias significativas según el test de LSD ($p \leq 0,05$).

Extracto	Tratamiento	Concentración [%]					
		100	80	40	20	10	5
Acetato de etilo	CNI	1,6 c	1,0 bc	1,3 a	1,8 a	20,8 a	61,0 a
	CI	0,4 a	0,4 a	2,0 a	3,3 a	15,0 a	69,4 ab
	<i>C. rigida</i>	1,1 b	1,4 c	3,4 b	6,5 b	54,8 b	86,7 c
	<i>T. versicolor</i>	0,7 ab	0,6 ab	3,2 b	5,3 b	65,2 b	87,4 c
	<i>Py. cinnabarinus</i>	0,9 b	1,0 bc	1,9 a	4,3 a	28,2 ab	85,5 bc
n-propanol	CNI	0,6 a	0,6 a	2,1 a	4,9 a	15,5 a	58,0 a
	CI	0,5 a	0,7 a	2,4 a	8,5 a	46,8 ab	71,7 ab
	<i>C. rigida</i>	2,8 b	3,7 c	28,3 c	83,9 c	90,8 d	94,2 b
	<i>T. versicolor</i>	3,0 b	2,5 b	8,1 b	45,7 b	75,4 cd	108,0 c
	<i>Py. cinnabarinus</i>	1,1 a	1,5 a	2,5 a	7,0 a	63,9 bc	79,2 ab
Metanol	CNI	2,9 bc	8,3 c	71,1 b	83,5 ab	102,0 a	115,1 a
	CI	1,2 a	3,3 a	30,5 a	60,7 a	87,7 a	90,6 a
	<i>C. rigida</i>	4,2 c	7,3 b	68,7 b	87,8 b	116,9 a	104,5 a
	<i>T. versicolor</i>	4,3 c	7,5 b	76,8 b	97,1 b	113,3 a	105,2 a
	<i>Py. cinnabarinus</i>	2,6 ab	3,7 a	33,2 a	94,7 b	96,1 a	105,8 a
Agua I	CNI	11,9 a	55,4 c	85,1 c	81,0 b	90,7 ab	99,9 a
	CI	10,4 a	27,7 b	64,8 b	74,5 ab	78,3 a	95,7 a
	<i>C. rigida</i>	36,7 b	67,8 d	107,2 d	109,1 c	131,3 c	126,2 b
	<i>T. versicolor</i>	9,0 a	11,4 a	23,2 a	77,8 b	113,1 ab	106,4 ab
	<i>Py. cinnabarinus</i>	3,5 a	7,4 a	27,6 a	52,9 a	104,3 ab	101,3 a
Agua II	CNI	2,2 a	4,8 a	47,2 bc	83,7 ab	103,2 b	98,6 a
	CI	1,0 a	2,2 a	18,5 a	61,3 a	75,4 a	79,6 a
	<i>C. rigida</i>	2,5 a	5,9 a	57,6 c	81,7 ab	78,6 a	82,6 a
	<i>T. versicolor</i>	6,5 b	24,4 b	39,5 b	76,2 ab	98,2 ab	86,9 a
	<i>Py. cinnabarinus</i>	2,0 a	4,9 a	26,5 a	93,0 b	107,0 b	105,3 a
Agua III	CNI	0,1 a	0,0 a	1,6 a	5,5 a	72,1 b	93,5 b
	CI	0,0 a	0,0 a	1,3 a	4,7 a	33,0 a	75,7 a
	<i>C. rigida</i>	0,0 a	0,4 a	2,3 a	10,3 a	51,7 a	61,5 a
	<i>T. versicolor</i>	0,9 a	1,1 b	30,2 b	53,8 b	72,8 b	86,2 ab
	<i>Py. cinnabarinus</i>	0,1 a	0,9 ab	1,5 a	5,7 a	48,0 a	86,3 ab

El extracto agua II inhibe la germinación cuando se aplica directamente tras la extracción a proporciones de 100, 80 y 40% (Tabla 5). La inoculación del extracto acuoso con los hongos redujo la fitotoxicidad respecto a su control pero solo a determinadas concentraciones. Cabe destacar que el efecto de *C. rigida* triplicó la germinabilidad respecto a su control incubado pero solo a la dosis de 40%. La inoculación con *T. versicolor* incrementó la germinabilidad respecto a su control incubado a concentraciones de extracto altas y *Py. cinnabarinus* solo redujo el índice de germinabilidad a concentraciones de extracto agua II bajas. *Py. cinnabarinus* mostró efecto fertilizante cuando se aplicó a las dosis de 10 y 5%.

La aplicación del extracto agua III inhibe la germinación de semillas de berro cuando éste se aplica directamente tras la extracción sin incubar a todos los porcentajes utilizados, salvo al 10 y 5% tal y como se observa en la Tabla 5. *T. versicolor* fue el único hongo efectivo en la eliminación de la fitotoxicidad de este extracto ya que igualó la germinabilidad de semillas de berro al control a varias concentraciones. En ningún caso se observó un efecto potenciador de la germinación de este extracto acuoso tras la inoculación de los distintos hongos.

Biomasa fúngica

Los hongos saprobios crecieron en todos los extractos de alpeorujo realizados en soxhlet. Se observó un mayor crecimiento de los hongos en los extractos acuosos, en especial en el extracto acuoso I, mientras que en los extractos de acetato de etilo y n-propanol fue donde los hongos crecieron menos.

Tabla 6. Peso seco del micelio (g) de los hongos cultivados en los extractos de alpeorujo realizados en soxhlet. Las letras distintas indican diferencias significativas según el test de Duncan ($P \geq 0,05$).

Tratamiento	EtOAc	n-propanol	Metanol	Agua I	Agua II	Agua III
<i>C. rigida</i>	0,29 ab	0,16 a	0,26 ab	0,80 c	0,66 bc	0,76 c
<i>T. versicolor</i>	0,09 a	0,12 a	0,47 b	1,86 e	0,44 b	1,14 d
<i>Py. cinnabarinus</i>	0,19 a	0,31 ab	0,44 b	0,67 bc	0,76 c	0,60 bc

Contenido fenólico

Compuestos fenolicos totales

El contenido fenólico del extracto de acetato de etilo de alpeorujó extractado mediante soxhlet de 7,09 g/kg de alpeorujó (Fig. 11A) disminuyó un 80% tras la incubación con los hongos saprobios seleccionados siendo *T. versicolor* el hongo más eficaz en su reducción. La cantidad de fenoles extraídos en el extracto de n-propanol y metanol fue de 6 y 4,30 g/kg de alpeorujó respectivamente, tal y como puede observarse en la Fig. 11B y C. Los hongos utilizados redujeron considerablemente la cantidad de fenoles presentes en estos extractos alcanzando reducciones del 78% al 92%, siendo los hongos *C. rigida* y *T. versicolor* los más efectivos en ambos extractos. El extracto agua I obtenido tras la extracción secuencial con los anteriores solventes en soxhlet y el agua II extraído a partir de extractos de acetato de etilo mostraron un contenido total en fenoles mayor que en los extractos anteriores 16,70 y 9,58 g/kg de alpeorujó respectivamente (Fig. 11D y E) que se redujo por igual con todos los hongos ensayados. El contenido fenólico del extracto agua III de alpeorujó tras su extracción en soxhlet fue el mayor de todos los extractos de alpeorujó (18 g/kg de alpeorujó) (Fig. 11F). El tratamiento de este extracto con los hongos seleccionados hizo disminuir el contenido fenólico drásticamente. Los resultados más significativos se obtuvieron tras la inoculación con *T. versicolor* que redujo hasta el 90% el contenido fenólico original mientras que *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* lo disminuyeron un 80 y 75% respectivamente.

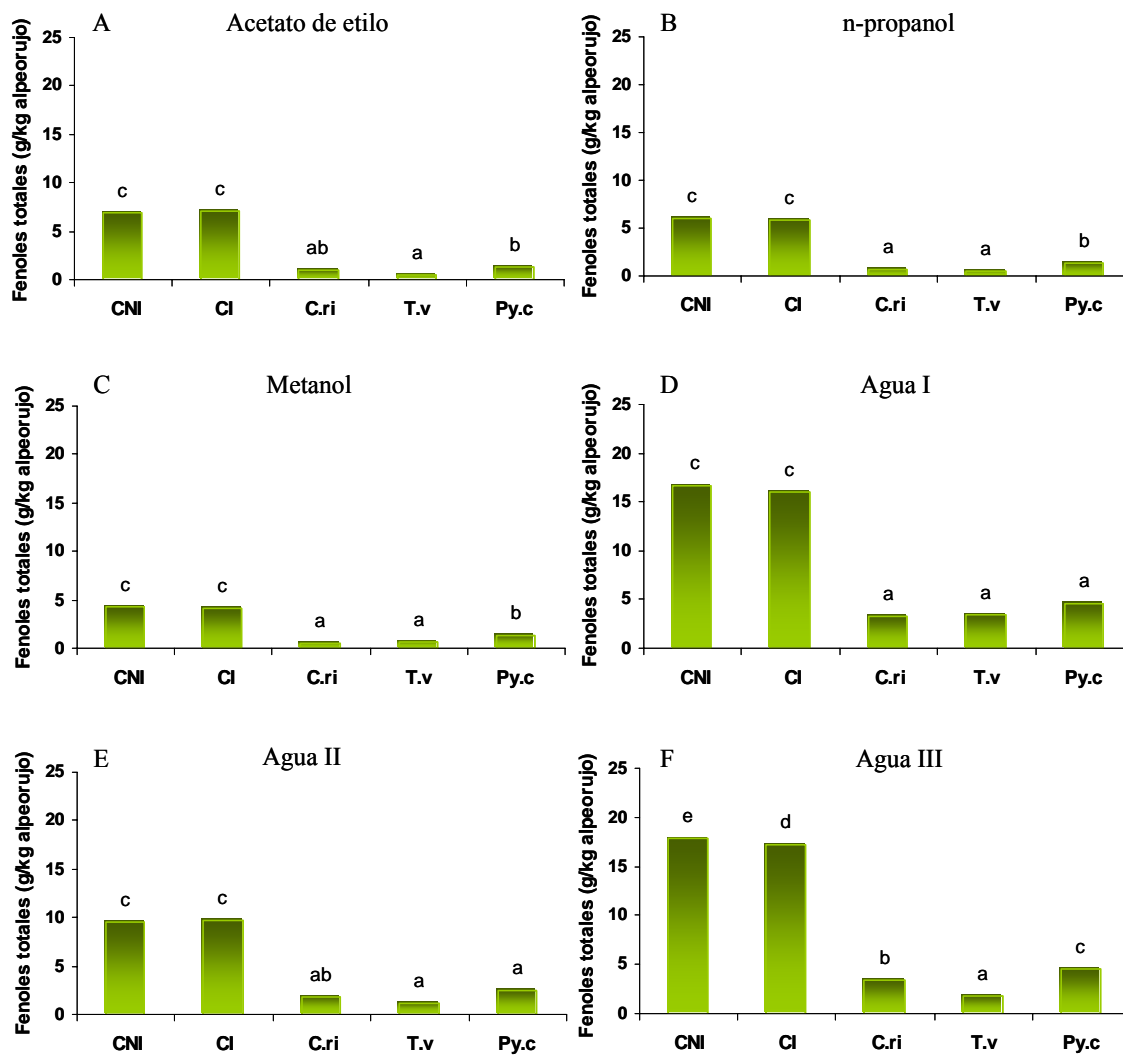


Fig 11. Contenido fenólico del extracto acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C), extracto agua I (D), agua II (E) y agua III (F) de alpeoruj realizados con soxhlet, sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto de alpeoruj indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Compuestos fenólicos simples

El extracto de acetato de etilo se analizó mediante HPLC-UV y se identificaron una serie de compuestos fenólicos de acuerdo con los tiempos de retención de los correspondientes picos y los estándares. Tras este análisis se observaron varios compuestos no detectados antes en alpeoruj (4, 7 y 11) y también un pico sin identificar (pico 5) (Fig. 12A). Para constatar la identificación de cada uno de los picos y para identificar los compuestos no detectados anteriormente en el alpeoruj se realizó

un segundo análisis MS/MS. Así observamos que por su esquema de fraccionamiento en MS/MS los picos 4 y 7 corresponderían al ácido dihidroximandélico ($t_r = 16,51$) y ácido tetrahidroximandélico ($t_r = 24,35$ min y $m/z = 215$). El pico 11 ($t_r = 50,85$ min y $m/z = 335$) podría corresponder al producto de oxidación de la forma dialdehídica de la dicarboximetil oleuropeina aglicona, compuesto encontrado en la oxidación del aceite de oliva virgen.

Podemos concluir que el perfil cromatográfico a 280 nm del extracto de acetato de etilo de alpeorajo (Fig. 12A) muestra que dicha fracción está constituida fundamentalmente por fenoles simples, ácidos fenólicos y en menor cantidad aldehídos, glicósidos secoiridoideos y flavonoides. Los principales fenoles monoméricos determinados fueron el hidroxitirosol (2), p-tirosol (3) y monoacetil hidroxitirosol (9). Los ácidos fenólicos encontrados en dicho extracto fueron el ácido protocatecuico (1), ácido dihidroximandélico (4), ácido vainílico (6), ácido tetrahidroximandélico (7), ácido p-cumárico (8) y ácido elenólico (10). Como aldehídos se determinó la forma dialdehídica del producto de oxidación de la dicarboximetil oleuropeina aglicona (11) y en menores cantidades se detectaron secoiridoideos como la oleuropeina (12) y ligustrósido (13) y flavonoides como la luteolina (14).

Cuando el extracto de acetato de etilo se trató con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* se observó un cambio drástico en el perfil cromatográfico. En el caso de la inoculación del extracto con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* desaparecieron prácticamente todos los compuestos quedando solo pequeñas cantidades de hidroxitirosol (2) y de los ácidos dihidroximandélico (4) y tetrahidroximandélico (7) en *C. rigida* (Fig. 12B) y solo pequeñas cantidades de p-tirosol (3) y el compuesto aún no determinado (5) en inoculaciones con *Py. cinnabarinus* (Fig. 12D). Cabe destacar la actuación de *T. versicolor* ya que eliminó completamente todos los compuestos fenólicos (Fig. 12C).

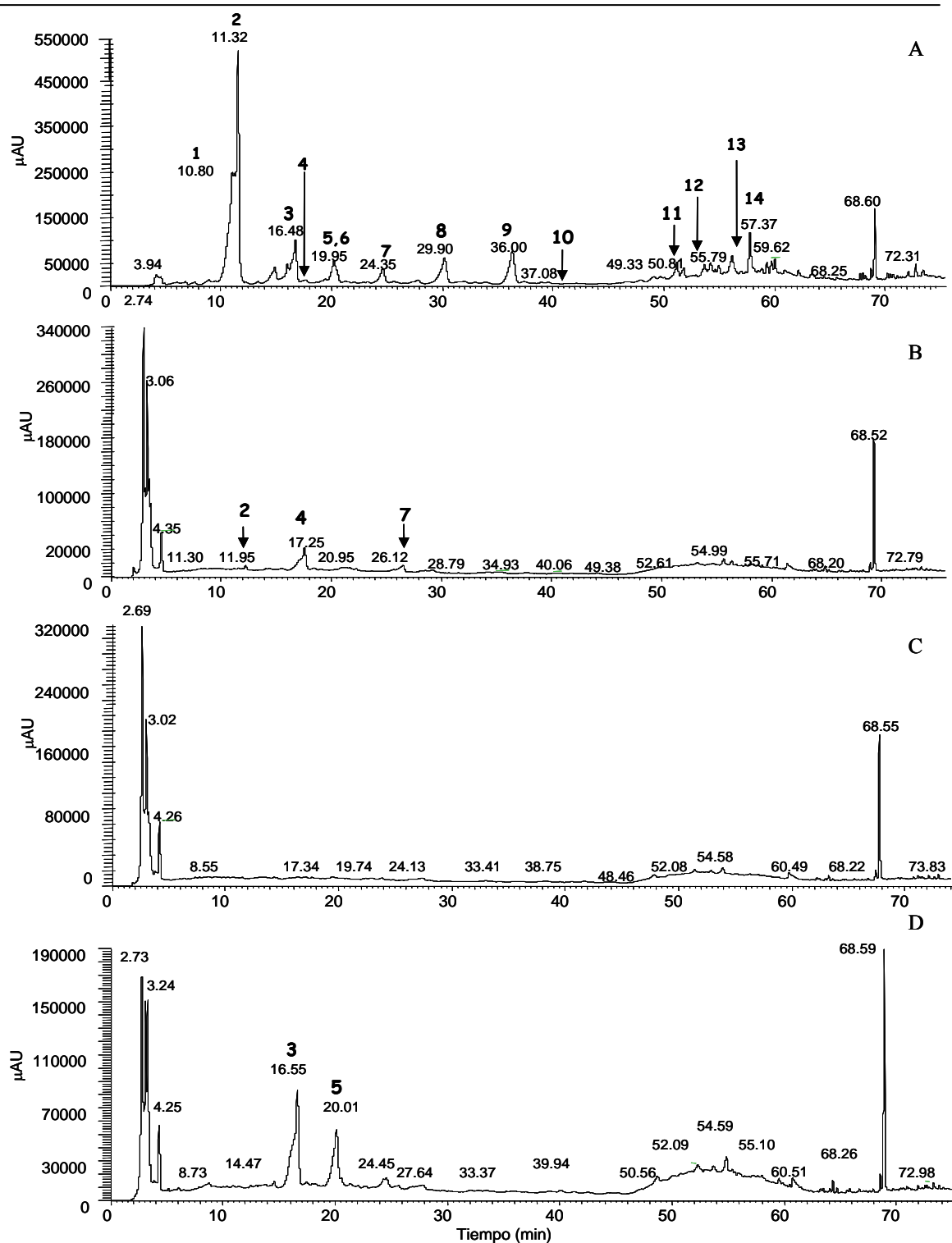


Fig. 12. Cromatograma HPLC a 280 nm del extracto de acetato de etilo de alpeorajo (A) inoculado con los hongos *C. rigida* (B), *T. versicolor* (C) y *Py. cinnabarinus* (D). Picos: (1) ácido protocatecuico, (2) hidroxitirosol, (3) p-tirosol, (4) ácido dihidroximandélico, (5) compuesto no identificado, (6) ácido vainílico, (7) ácido tetrahidroximandélico, (8) ácido p-cumárico, (9) monoacetil hidroxitirosol, (10) ácido elenólico, (11) forma dialdehídica de la dicarboximetil oleuropeina aglicona oxidada, (12) oleuropeina, (13) ligustrósido y (14) luteolina.

Los estudios de HPLC-UV del extracto n-propanol de alpeorajo nos reveló pequeñas cantidades de hidroxitirosol (2), ácido protocatecuico (1) e hidroxitirosol glucósido (3). En este extracto se han detectado picos que no estaban presentes en el extracto de acetato de etilo como el pico 4 ($t_r = 16,69$ min y $m/z = 359$) cuya estructura no se pudo definir con el análisis MS/MS (Fig. 13A). A tiempo de retención de 26,45 min y con una relación m/z de 389 se observó un pico en el cromatograma de masa que no se detectó con el HPLC-UV a 280 nm (pico 5) que tras analizarlo por tandem MS/MS sugirió su espectro que se trataba de un oleósido, compuesto normalmente presente en las aceitunas. A tiempo de retención de 56,40 min y con $m/z = 535$ se encontró otro pico en el espectro de masa que tras su análisis MS/MS se identificó como 6'- β -ramnopiranosil-oleósido (11), compuesto no descrito hasta el momento en el alpeorajo. El resto de compuestos determinados fueron luteolina (12) y sus derivados glucósido (8) y rutinósido (9), oleuropeina (10) y su aglicona (6) y ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (7) como fenol monomérico. Podemos concluir que tras la extracción con n-propanol del alpeorajo se obtuvieron fundamentalmente fenoles del tipo flavonoides y secoiridoides.

Hemos observado que los hongos saprobios cultivados en el extracto n-propanol modificaron la composición fenólica eliminando todos los fenoles identificados (Fig. 13B, C y D). Tras la incubación de este extracto con *C. rigida*, aparecieron pequeñas cantidades de un compuesto no identificado en el extracto original, el ácido dihidroximandélico (13) (Fig. 13B).

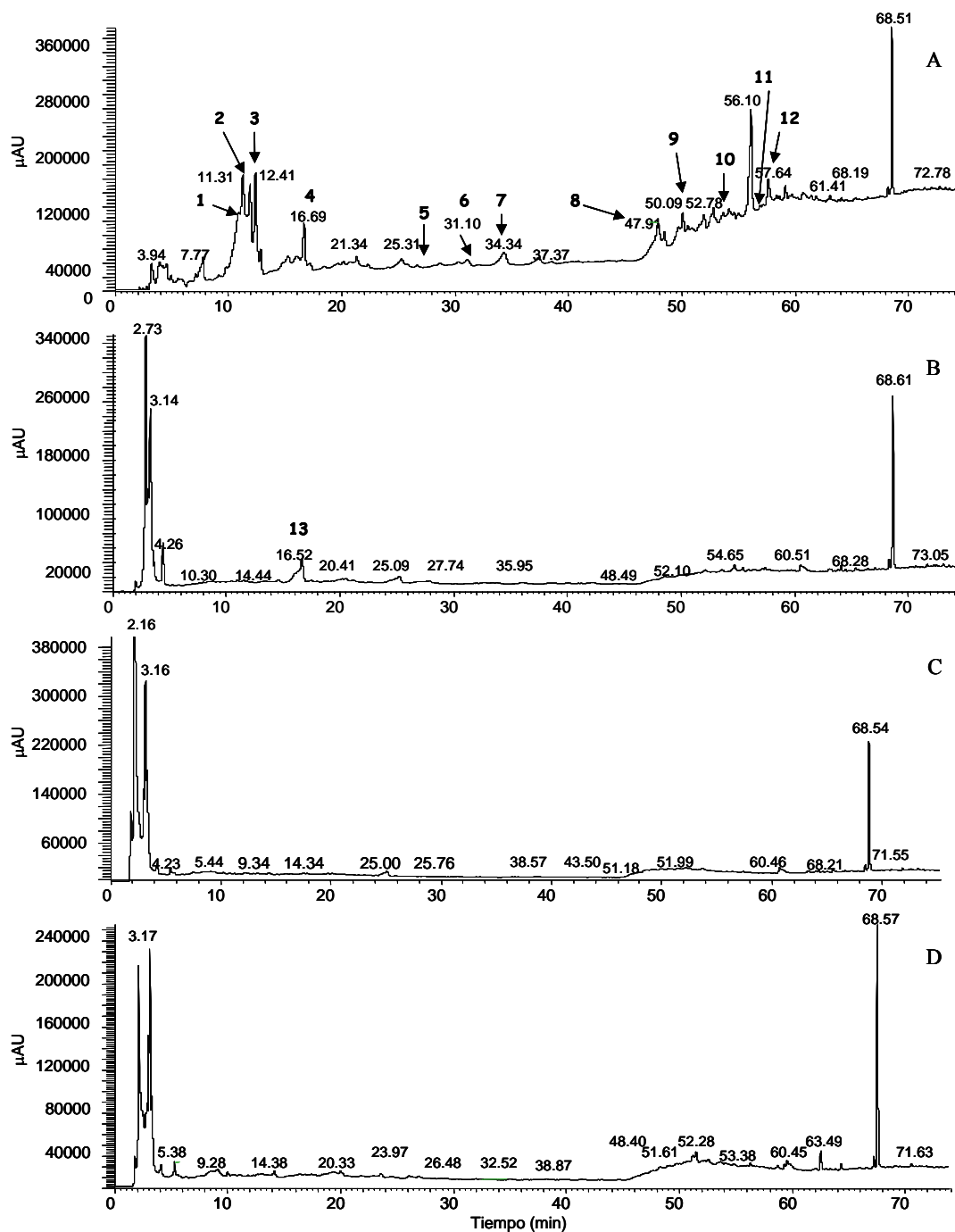


Fig. 13. Cromatograma HPLC a 280 nm del extracto de n-propanol de alpeorujó (A) inoculado con los hongos *C. rigida* (B), *T. versicolor* (C) y *Py. cinnabarinus* (D). Picos: (1) ácido protocatecuico, (2) hidroxitirosol, (3) hidroxitirosol glucósido, (4) compuesto no identificado, (5) oleósido, (6) oleuropeína aglicona, (7) ácido 3,4,5 trimetoxibenzoico, (8) luteolina-glucósido, (9) luteolina rutinósido, (10) oleuropeína, (11) 6'-β-ramnopiranosil-oleósido, (12) luteolina y (13) ácido dihidroximandélico.

Los compuestos fenólicos identificados mediante HPLC-UV/MS del extracto metanólico de alpeorujó fueron similares a los obtenidos en el extracto de n-propanol. A un tiempo de retención de 25,27 min (picos 4 y 5) en el perfil HPLC-UV se observaron dos compuestos en coelución; el primero corresponde a un oleósido (4) que no absorbe a 280 nm y el segundo, posiblemente el responsable de la absorción a 280 nm, con un pico m/z de 481 que no pudo ser determinado estructuralmente con el análisis MS/MS. El pico 10 cuyo tiempo de retención fue de 54,40 min, tras su comprobación con MS/MS, se atribuyó al 6'- β -glucopiranosil-oleósido, otro derivado del oleósido identificado en la aceituna. Se detectó también otro oleósido con un tiempo de retención de 50,09 min, el 6'- β -ramnopiranosil-oleósido (11). El resto de componentes fueron fundamentalmente del tipo flavonoide: luteolina-glucósido (7), luteolina rutinósido (8) y luteolina (12); secoiridoides: oleuropeina (9) y su aglicona (6) y oleósidos y fenoles monoméricos en baja proporción: hidroxitirosol (2), hidroxitirosol-glucósido (3) y ácido protocatecuico (1) (Fig. 14A). Cuando el extracto metanólico se incubó con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* se observó una desaparición total de los fenoles mostrados en el cromatograma del extracto sin incubar (Fig. 14B, C y D).

La separación mediante HPLC-UV de la fracción agua I del alpeorujó reveló la presencia de pequeñas cantidades de fenoles simples: hidroxitirosol (1) e hidroxitirosol glucósido (2); secoiridoides: oleuropeina (8), oleuropeina aglicona (4) y ligustrósido (11); de flavonoides glicosilados: luteolina-glucósido (5) y luteolina rutinósido (6) así como verbascosido (7) y oleósidos como el pico (3), 6'- β -glucopiranosil-oleósido (9) y 6'- β -ramnopiranosil-oleósido (10) (Fig. 15A). A 280 nm se detectó un gran pico de una mezcla de compuestos inseparables con un tiempo de retención entre 46 y 68 min en el que aparecen coeluidos secoiridoides y flavonoides glicosilados (12). Esta mezcla de compuestos puede ser similar a la polimerina que según describen numerosos autores es una mezcla de polímeros orgánicos de color oscuro. Tras la incubación del extracto agua I con *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* se observó la desaparición de los fenoles descritos, salvo el de la mezcla de compuestos coeluidos que no sufrió ninguna modificación (Fig. 15B, C y D).

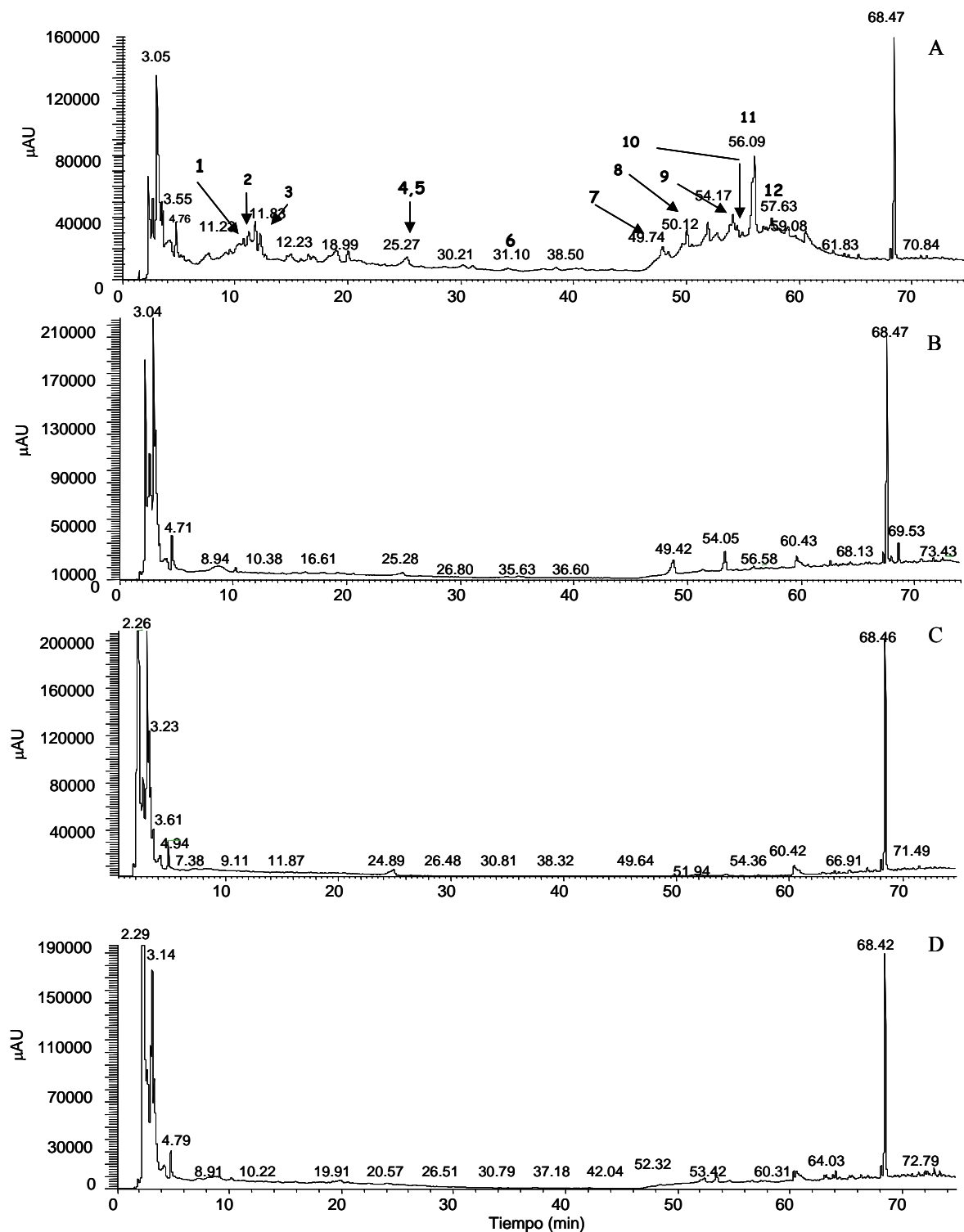


Fig. 14. Cromatograma HPLC a 280 nm del extracto de metanol de algarrobo (A) inoculado con los hongos *C. rigida* (B), *T. versicolor* (C) y *Py. cinnabarinus* (D). Picos: (1) ácido protocatecuico, (2) hidroxitirosol, (3) hidroxitirosol glucósido, (4) oleósido, (5) compuesto desconocido, (6) oleuropeina aglicona, (7) luteolina-glucósido, (8) luteolina rutinósido, (9) oleuropeina, (10) 6'-β-glucopiranosil-oleósido, (11) 6'-β-ramnopiranosil-oleósido y (12) luteolina.

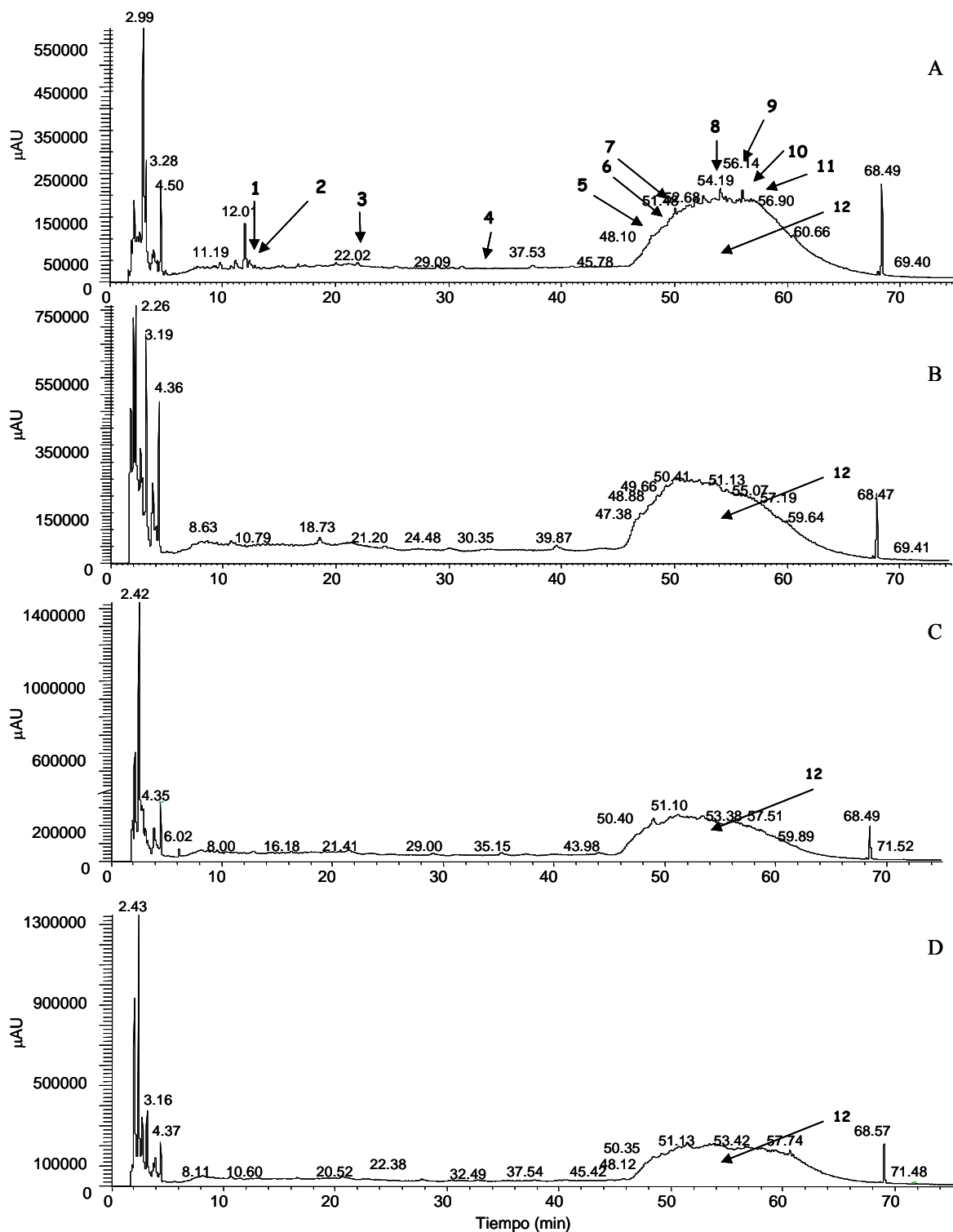


Fig. 15. Cromatograma HPLC a 280 nm del extracto de acuoso de alpeorujó (A) inoculado con los hongos *C. rigida* (B), *T. versicolor* (C) y *Py. cinnabarinus* (D). Picos: (1) hidroxitirosol, (2) hidroxitirosol glucósido, (3) oleósido, (4) oleuropeina aglicona (5) luteolina-glucósido, (6) luteolina rutinósido, (7) verbascósido, (8) oleuropeina, (9) 6'- β -glucopiranosil-oleósido, (10) 6'- β -ramnopiranosil-oleósido, (11) ligustrósido y (12) polimerina.

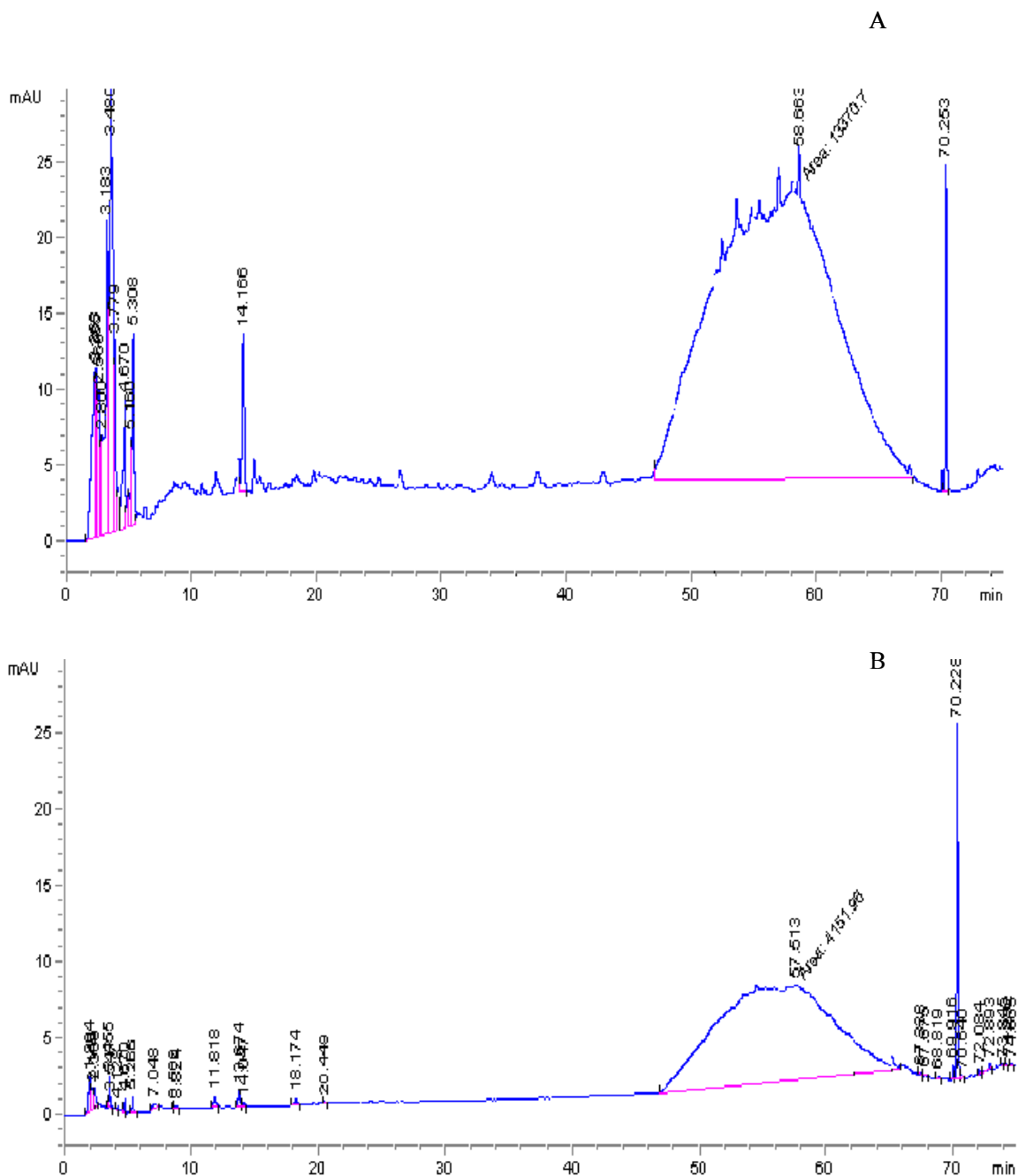


Fig. 16. Cromatograma HPLC-UV de la polimerina del extracto acuoso de alpeorujo (A) y de la polimerina de alpechín (B).

Para determinar la similitud entre la polimerina aislada del alpechín y el gran pico de una mezcla de componentes inseparables descritos en la fracción agua I del alpeorujo se realizaron análisis paralelos mediante HPLC-UV (Fig. 16). Se ha observado que el cromatograma de ambas fracciones fue muy similar por lo que podemos concluir que el pico encontrado en el extracto agua I de alpeorujo podría ser la polimerina.

Contenido en azúcares totales

El extracto de acetato de etilo de alpeorujó mostró los niveles más bajos de azúcares (3,82 mg/g de alpeorujó) detectados en todos los extractos de alpeorujó ensayados y su tratamiento con hongos saprobios no modificó dicho contenido (Fig. 17A). Los extractos de n-propanol y metanol contenían también cantidades pequeñas de azúcares (24 y 33 mg/g de alpeorujó respectivamente) que al igual que ocurrió en el extracto de acetato de etilo, no se redujo tras su inoculación con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* (Fig. 17B y C). En el extracto agua I de alpeorujó el contenido glucídico detectado de 23 mg/g de alpeorujó disminuyó tras la incubación de *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* (Fig. 17D). La cantidad de azúcares totales determinada en los extractos agua II y III de 43 y 75 mg/g de alpeorujó respectivamente, se redujo sensiblemente por todos los hongos utilizados en este ensayo (Fig. 17E y F). *T. versicolor* fue el hongo que más disminuyó la cantidad de azúcares, en este extracto, entre un 60 y 75%, mientras que *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* solo la redujeron a la mitad.

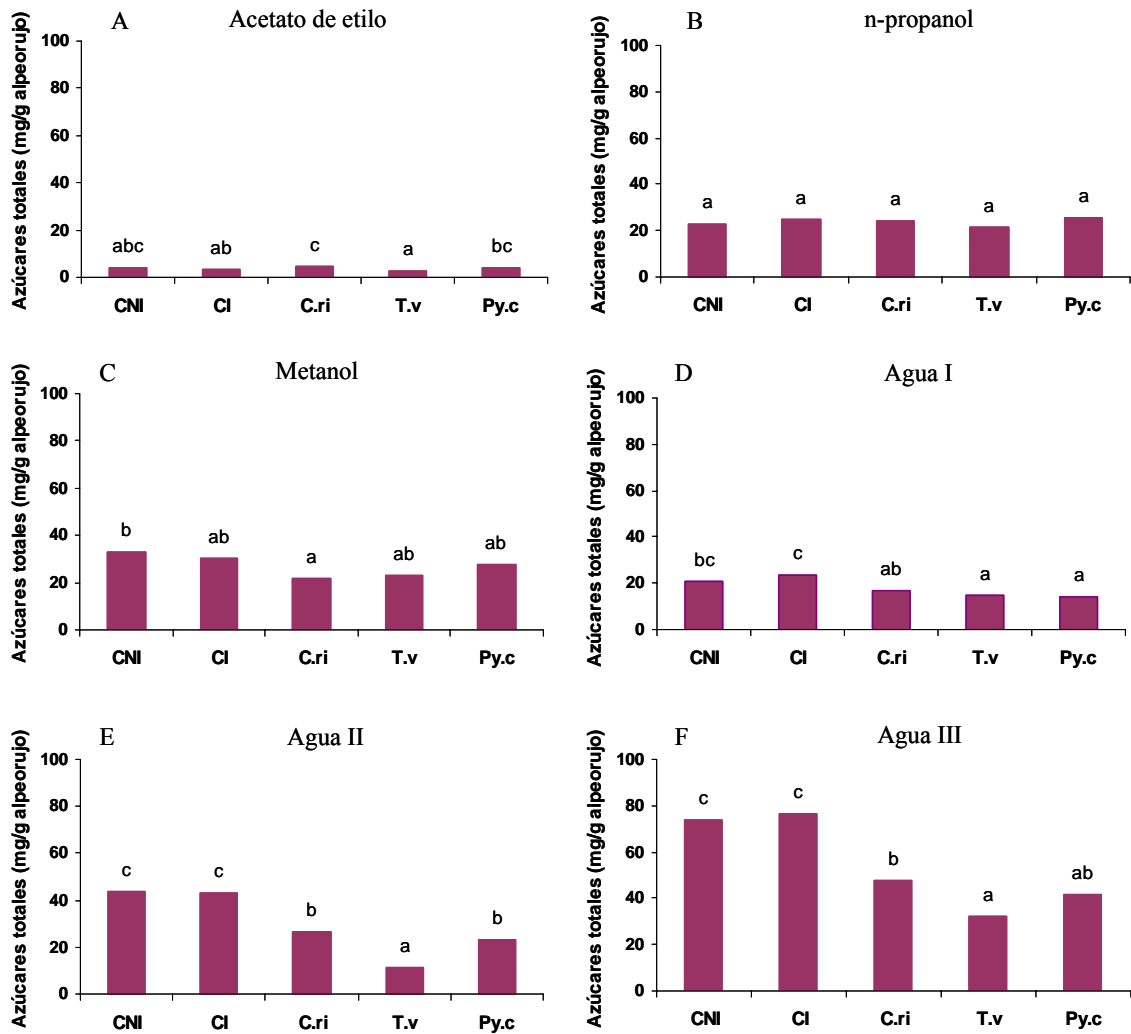


Fig. 17. Contenido en azúcares totales del extracto acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C), agua I (D), agua II (E) y agua III (F) de alpeoruj realizados con soxhlet, sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Actividades hidrolíticas

Los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* mostraron actividades endo-PMG, endo-GN y endo-XG en la mayoría de los extractos de alpeoruj realizados con soxhlet. Aunque los niveles de producción de estas enzimas hidrolíticas fueron variables, se observó que los valores de actividad endo-GN fueron superiores a los de endo-PMG y endo-XG.

Los extractos de acetato de etilo, n-propanol y metanol en general mostraron niveles de actividad endohidrolítica muy baja (Fig. 18A, B y C). Los niveles de actividad endo-PMG producidos por los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* no llegaron a superar en ninguno de los casos las 40 UI/g de alpeorujo. Solo *Py. cinnabarinus* produjo niveles considerables de actividad endo-GN. Se ha observado que la actividad endo-XG fue prácticamente nula en estos extractos.

En los extractos agua I, II y III de alpeorujo la producción de enzimas endohidrolíticas fue en general superior a la producida en los extractos de acetato de etilo, propanol y metanol obtenidos en la extracción secuencial, tal y como se observa en la Fig. 18D, E y F. En el extracto de agua I los tres hongos ensayados produjeron distinta actividad endo-PMG, endo-GN y endo-XG. *Py. cinnabarinus* mostró la mayor actividad endo-PMG. La actividad endo-XG fue también variable en los distintos hongos, así *Py. cinnabarinus* fue el hongo que más actividad mostró, como en el caso de la actividad endo-GN y endo-PMG pero en este caso *T. versicolor* produjo niveles muy bajos de esta actividad (Fig. 18D). En el extracto agua II y III las actividades observadas fueron diferentes a las detectadas en el extracto acuoso I (Fig. 18D, E y F). La actividad endo-PMG de los extractos agua II y III no superaron los 50 UI/g de alpeorujo. Se produjeron niveles altos de actividad endo-GN y endo-XG en extractos de agua II y III de alpeorujo inoculados con los hongos *Py. cinnabarinus* y *C. rigida* respectivamente.

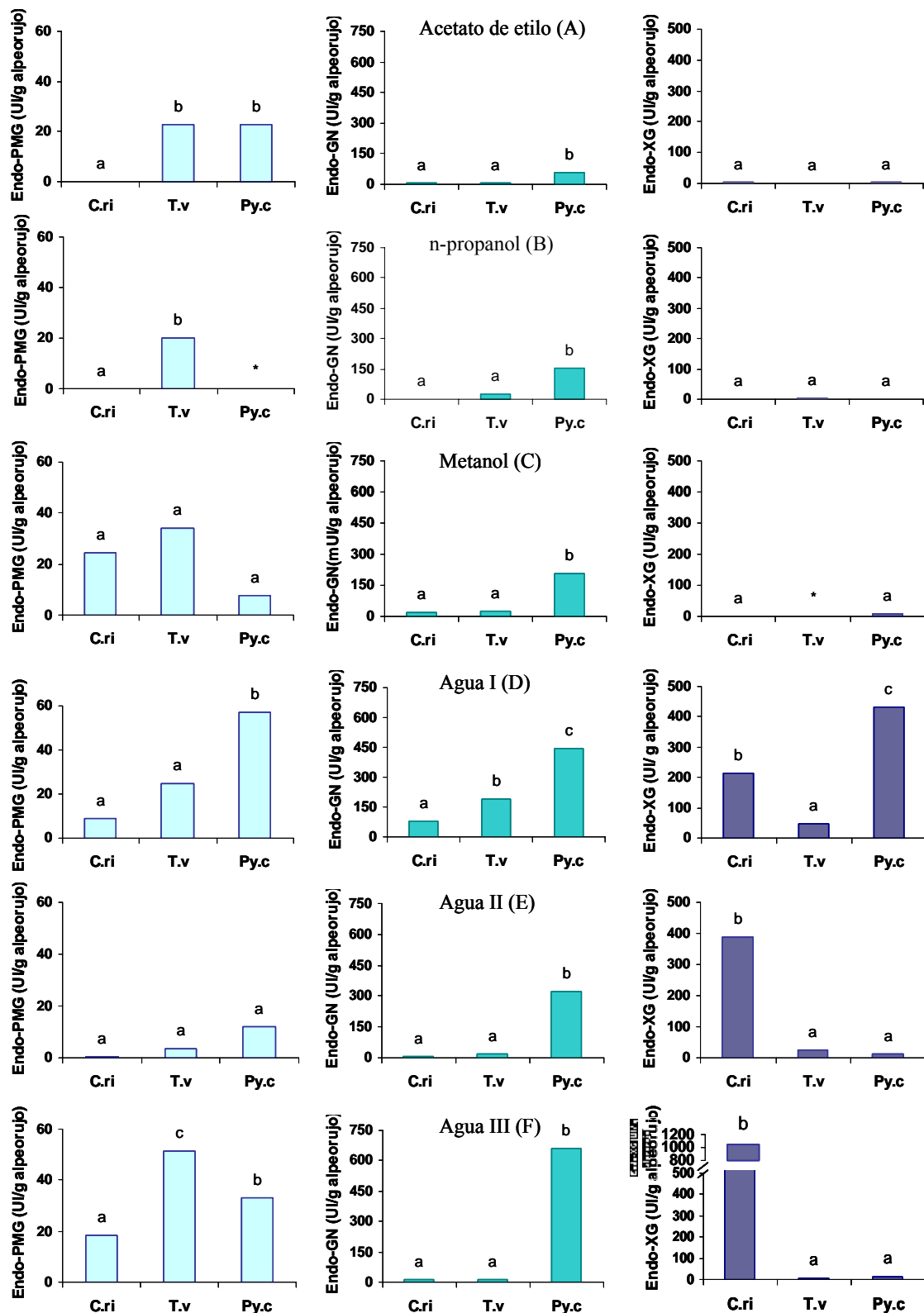


Fig. 18. Actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG) detectada en el extracto acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C), agua I (D), agua II (E) y agua III (F) de alpeorujos realizados con soxhlet inoculados con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto de alpeorujos y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

Actividades ligninolíticas

Los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* mostraron actividad lacasa y Mn peroxidasa en los extractos de alpeorujó realizados con soxhlet. En general los niveles de producción de lacasa fueron menores en los extractos de acetato de etilo y propanol, mientras que en el resto de los extractos se detectó una gran actividad. La actividad Mn peroxidasa fue homogénea en todos los extractos obtenidos en soxhlet con valores nunca superiores a las 9 mUI/g de alpeorujó

En el extracto de acetato de etilo los hongos tuvieron una actividad lacasa similar aproximada de 35 mUI/g de alpeorujó tal y como observamos en la Fig. 19A. La inoculación del extracto de n-propanol dio lugar a una actividad lacasa elevada en el caso de *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* mientras que *T. versicolor* fue el que mostró menos actividad (Fig. 19B). La actividad lacasa en extractos metanólicos y agua II tuvieron un comportamiento similar ya que fue la incubación con *Py. cinnabarinus* la que mostró los mayores valores de dicha actividad (Fig. 19C y E). En los extractos agua I y III la actividad lacasa producida por los distintos hongos saprobios utilizados fue opuesta. Así *C. rigida* fue el hongo con mayor producción de actividad lacasa en el extracto agua I y el que produce menos en el extracto agua III (Fig. 19D y F). Por otro lado *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* tuvieron poca actividad en el extracto agua I y mucha actividad en el agua III. La actividad lacasa producida por los hongos ligninolíticos incubados en el extracto agua III fue la más alta de los extractos estudiados con valores cercanos a las 1.000 mUI/g de alpeorujó cuando se incubó con *Py. cinnabarinus* y de 900 mUI/g de alpeorujó en el caso de *T. versicolor*.

La actividad Mn peroxidasa mostró un comportamiento similar en los extractos acetato de etilo y metanol siendo *Py. cinnabarinus* el que más actividad desarrolló (Fig. 19A y C). En los extractos n-propanol y agua III fue mayor esta actividad tras la incubación con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* mientras que *T. versicolor* mostró una actividad significativamente menor a la producida por el resto de los hongos (Fig. 19B y F). La actividad Mn peroxidasa detectada en el extracto agua I y II inoculado con *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* fue similar, mientras que *C. rigida* mostró valores inferiores (3 mUI/g de alpeorujó) (Fig. 19D y E).

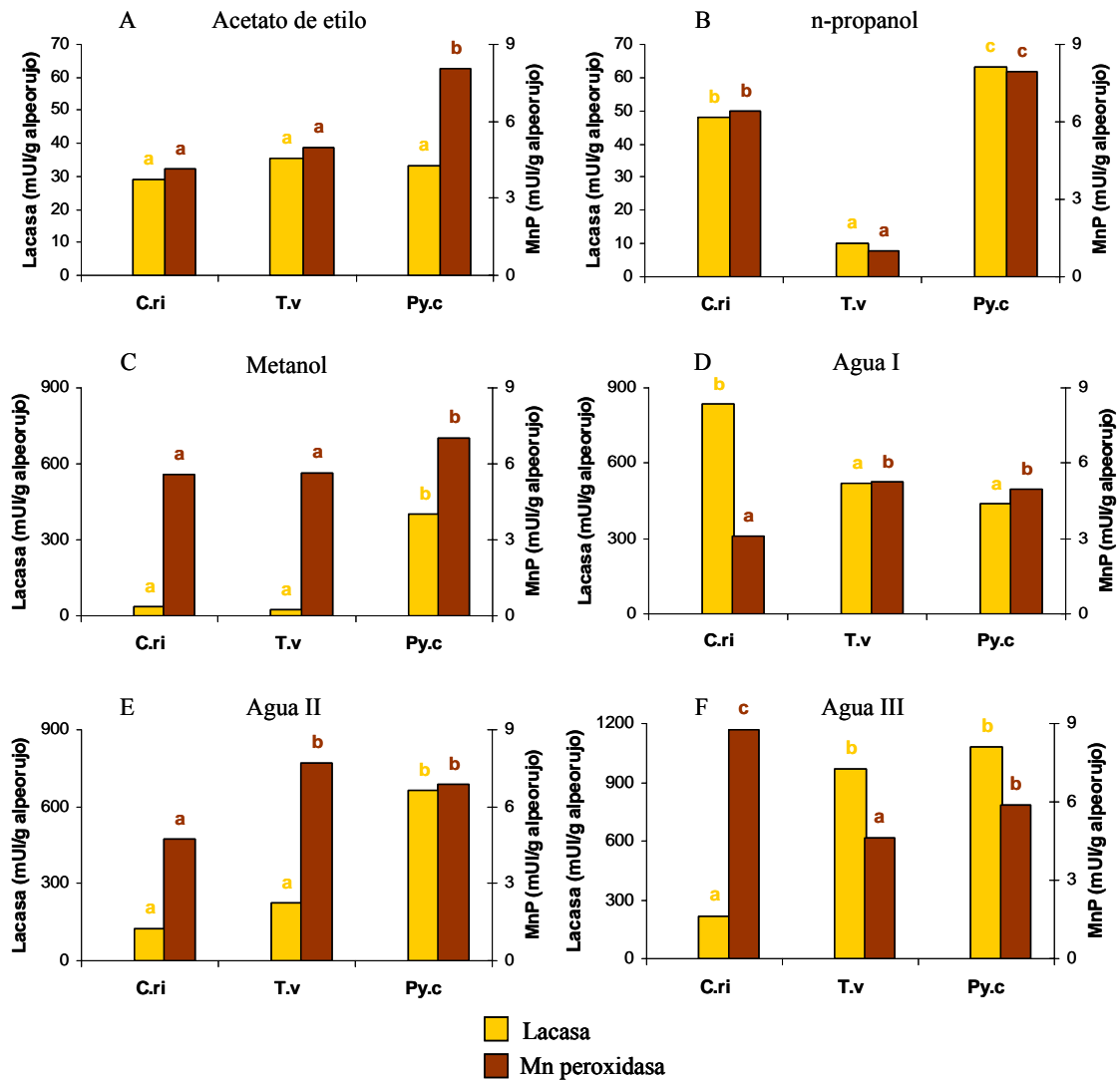
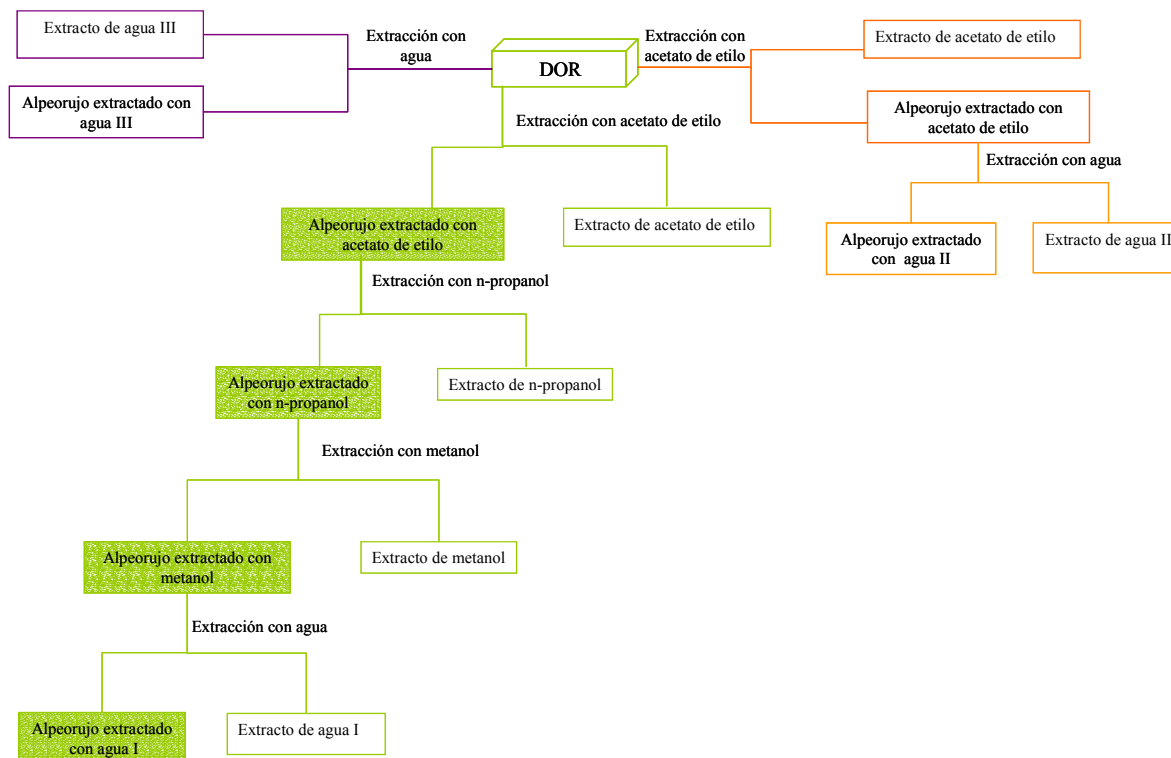


Fig. 19. Actividad lacasa y Mn peroxidasa detectada en el extracto acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C), agua I (D), agua II (E) y agua III (F) de alpeorjuo realizados con soxhlet inoculados con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto de alpeorjuo y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). * = actividad no detectada.

3.2.2. Alpeorujos extractados mediante soxhlet

Esquema 4. Esquema del proceso de extracción del alpeorujos seco y extractado con soxhlet.



Fitotoxicidad de los alpeorujos extractados mediante soxhlet

Los ensayos de germinación de semillas de berro con alpeorujos extractados con los distintos solventes en soxhlet muestran como los alpeorujos extractados con acetato de etilo y el alpeorujos extractados con acetato de etilo y n-propanol resultaron fitotóxicos a todas las dosis aplicadas. Esta fitotoxicidad se redujo tras la extracción con acetato de etilo, n-propanol y metanol cuando se aplicó a las dosis mayores llegando a eliminarse en el caso del alpeorujos extractados con todos los solventes (Agua I) (Tabla 7).

La inoculación del alpeorujos extractados con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua I con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* aumentan el porcentaje de germinabilidad de las semillas de berro en algunos casos. Así, en el extracto n-propanol todos los hongos ensayados a dosis de 3 y 4% aumentaron la germinabilidad de las semillas de berro, llegando *C. rigida* a duplicar el porcentaje de germinación respecto al control. La inoculación del alpeorujos extractados con todos los

solventes (Agua I) con los hongos saprobios mostró un efecto potenciador de la germinación de semillas (Tabla 7).

Tabla 7. Índice de germinabilidad (%) de semillas de berro (*L. sativum* L.) en presencia de alpeorajo extractado con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua I sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculados con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras en cada columna para cada extracto indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Alpeorajo extractado	Tratamiento	Concentración (%)		
		4	3,5	3
Acetato de etilo	CNI	23,6 a	45,2 a	50,3 a
	CI	23,4 a	53,5 a	58,1 ab
	<i>C. rigida</i>	29,4 a	56,4 ab	80,5 b
	<i>T. versicolor</i>	32,9 a	88,6 b	91,8 b
	<i>Py. cinnabarinus</i>	24,2 a	64,3 ab	76,3 b
n-propanol	CNI	21,7 a	54,2 a	57,8 a
	CI	24,1 a	55,2 ab	58,8 a
	<i>C. rigida</i>	39,1 b	76,2 ab	99,9 c
	<i>T. versicolor</i>	36,8 b	67,1 ab	80,6 b
	<i>Py. cinnabarinus</i>	35,2 b	76,5 ab	77,1 ab
Metanol	CNI	33,9 ab	63,9 a	76,8 a
	CI	36,4 ab	67,2 a	84,3 a
	<i>C. rigida</i>	35,8 ab	60,3 a	84,9 a
	<i>T. versicolor</i>	42,8 b	94,8 b	87,9 a
	<i>Py. cinnabarinus</i>	21,1 a	58,4 a	72,8 a
Agua I	CNI	60,3 a	79,5 a	100,3 a
	CI	63,3 a	90,3 a	110,1 a
	<i>C. rigida</i>	65,8 a	171,2 c	161,6 b
	<i>T. versicolor</i>	84,9 b	138,2 b	90,3 a
	<i>Py. cinnabarinus</i>	79,3 ab	100,1 b	159,9 b

Contenido fenólico

El contenido fenólico detectado en el alpeorajo extractado secuencialmente con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua fue de 20,4; 17,7; 16,2 y 2,1 g/kg de

alpeorujos respectivamente (Fig. 20). Se observa que el proceso de incubación de los diferentes alpeorujos extractados provocó un descenso significativo del contenido fenólico salvo en el caso del extracto Agua I. Los hongos seleccionados tuvieron un comportamiento similar tras su incubación durante 20 semanas con los alpeorujos extractados con acetato de etilo, n-propanol y metanol (Fig. 20A, B y C). Así *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* disminuyeron significativamente el contenido fenólico en todos los alpeorujos extractados mientras que *T. versicolor* no lo redujo en ninguno de ellos. En los alpeorujos extractados con acetato de etilo y n-propanol los hongos *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* redujeron un 75% del contenido inicial, sin embargo en el alpeorujos extractado con metanol la reducción fue inferior, entre un 60 y 40% respectivamente. El extracto agua I mostró un contenido fenólico muy bajo que no disminuyó tras el tratamiento biológico con hongos saprobios (Fig. 20 D).

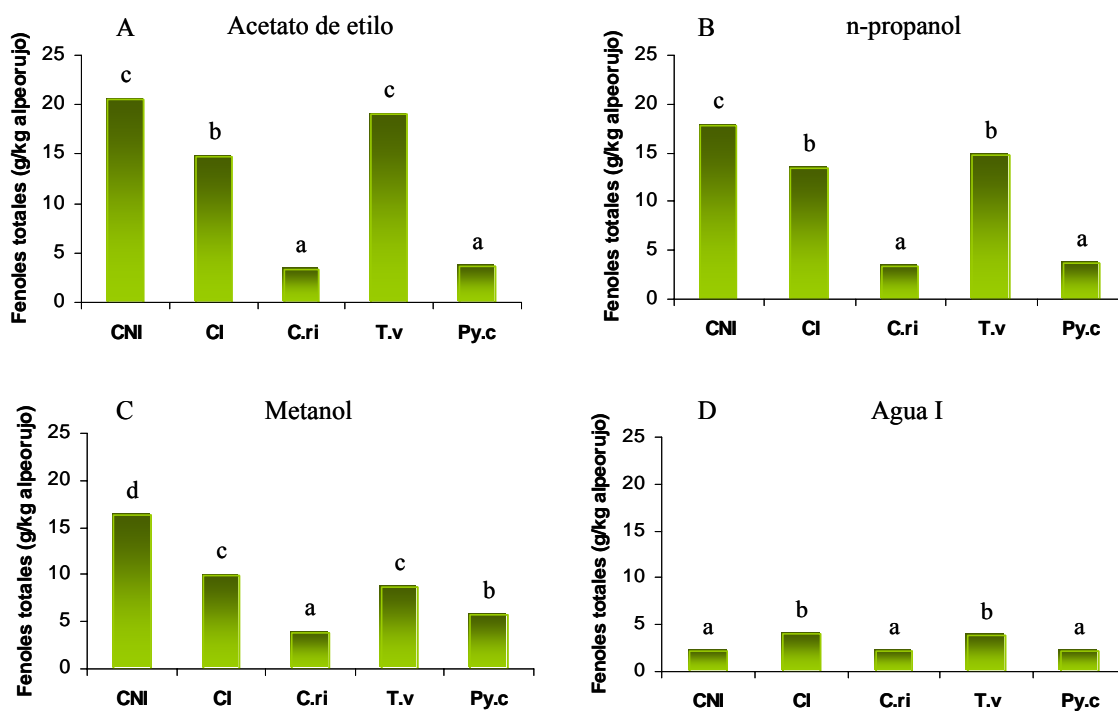


Fig. 20. Contenido fenólico del alpeorujos extractado con acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C) y agua I realizados con soxhlet sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada extracto indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Contenido en azúcares

El contenido en azúcares totales a lo largo de la extracción secuencial fue de 95, 76, 69 y 15 mg/g de alpeorujos en el alpeorujos extractados con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua I respectivamente. La incubación de los alpeorujos extractados no modificó significativamente el contenido glucídico de los mismos (Fig. 21). Cuando el alpeorujos extractado con acetato de etilo y n-propanol se inoculó con los hongos saprobios se observó una reducción importante que fue más significativa en el alpeorujos extractado con acetato de etilo. *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* fueron los hongos más efectivos en la metabolización de los azúcares en estos sólidos mientras que *T. versicolor* disminuyó levemente los azúcares totales (Fig. 21A y B). En el alpeorujos extractado con metanol e inoculado con los hongos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* se observó una eliminación similar del contenido en azúcares cercana al 70% (Fig. 21C). La cantidad de azúcares detectada en el alpeorujos extractado con agua I fue muy baja ya que solo se detectaron 15,7 mg/g de alpeorujos que se redujeron en un 60 y 40% por la inoculación de *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* respectivamente, mientras que *T. versicolor* no modificó la cantidad de los mismos (Fig. 21D).

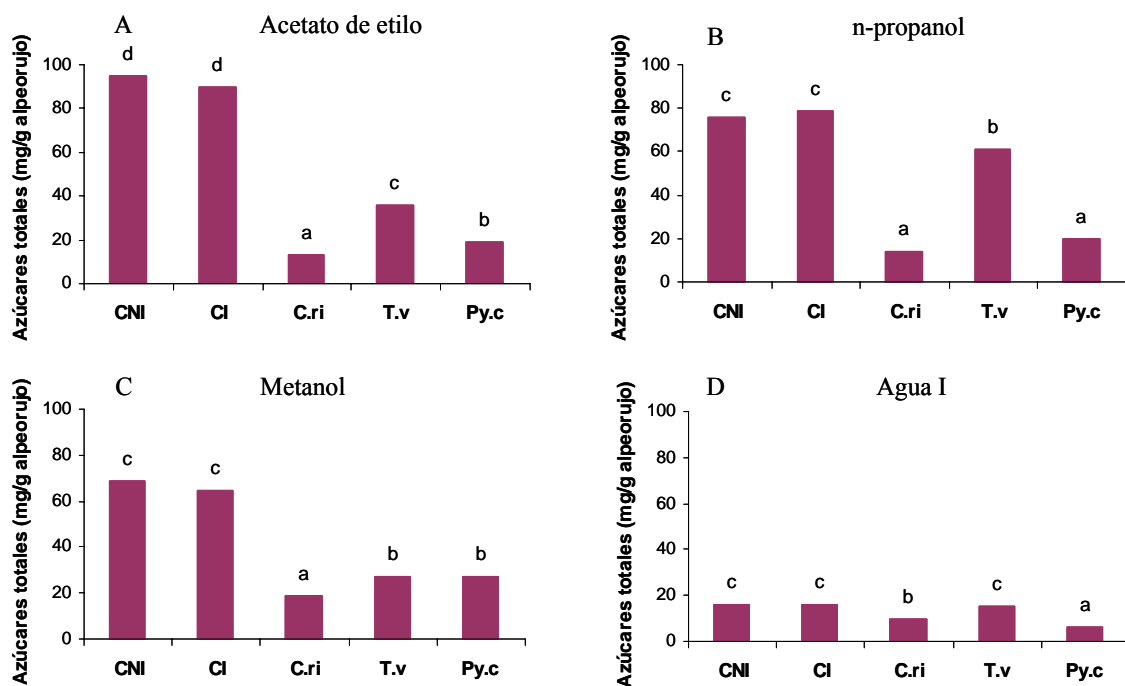


Fig. 21. Contenido en azúcares totales del alpeoruj extractado con acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C) y agua I realizados con soxhlet, sin incubar (CNI) e incubado sin hongo (CI) o inoculado con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada alpeoruj extractado indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Actividades hidrolíticas

En el alpeoruj extractado con los diferentes solventes e inoculado con los distintos hongos saprobios se detectaron actividades endo-PMG, endo-GN y endo-XG aunque los niveles de producción de estos enzimas hidrolíticas fueron variables. La actividad endo-PMG mostró los valores más bajos de las actividades hidrolíticas detectadas mientras que los niveles de actividad endo-GN y endo-XG fueron mucho más superiores. Los valores de actividad endo-XG fueron en general el doble que los de actividad endo-GN para cada uno de los alpeorujos extractados. La pauta de actuación de los hongos saprobios fue similar para todas las actividades y en casi todos los alpeorujos extractados estudiados. El hongo que produjo mayores actividades endohidrolíticas en todos los alpeorujos extractados fue *Py. cinnabarinus* mientras que *T. versicolor* tuvo menor actividad (Fig. 22).

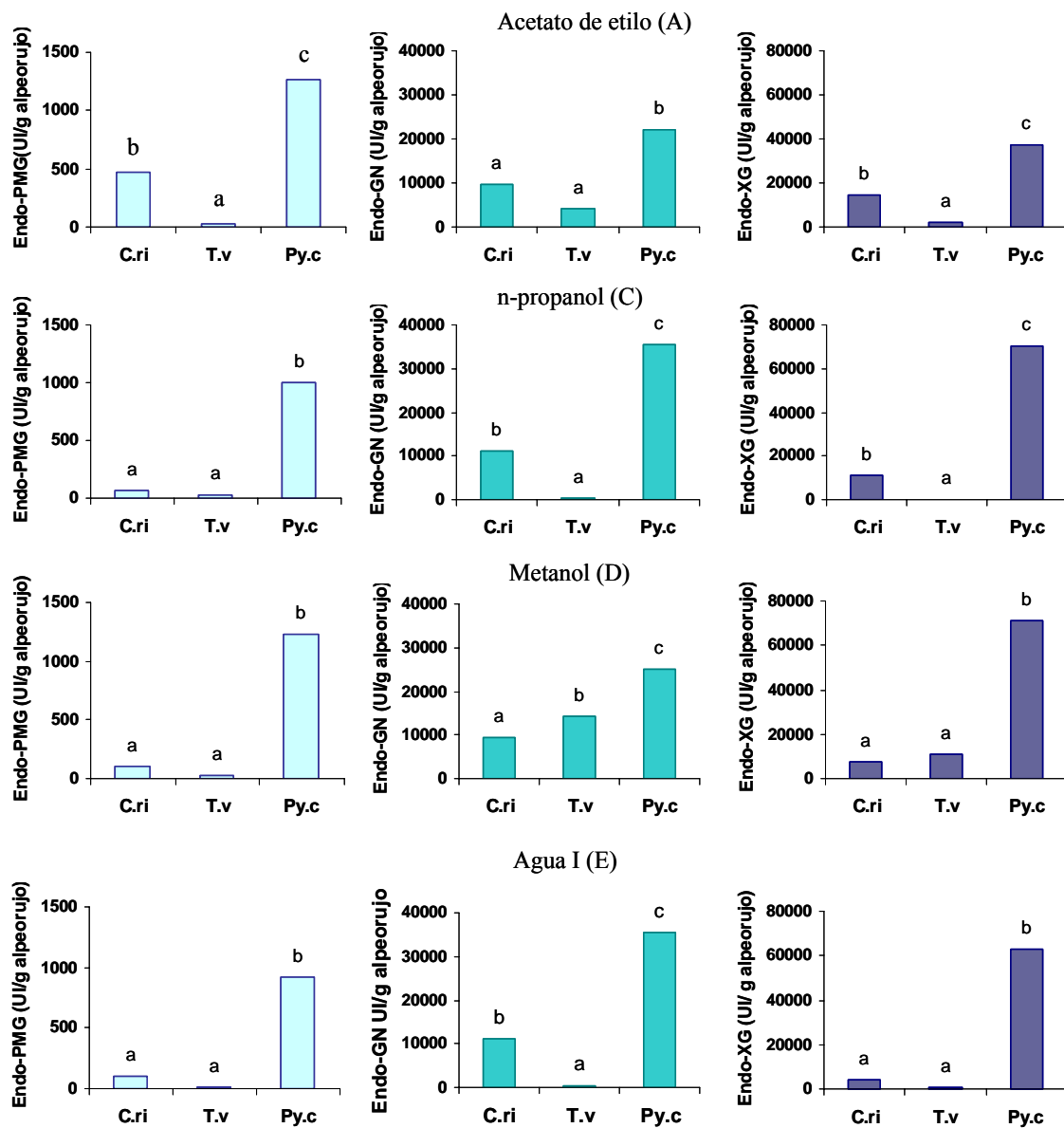


Fig. 22. Actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG) detectada en el alpeorujos extractado con acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C) y agua I (D) realizado con soxhlet inoculado con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada alpeorujos extractado y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

Actividades ligninolíticas

En líneas generales, en la mayoría de los alpeorujos extractados con los diferentes solventes y tratados con los hongos saprobios seleccionados, se detectó actividad lacasa y Mn peroxidasa con un patrón muy diferente según el alpeorujo extractado y hongo utilizado (Fig. 23).

El alpeorujo extractado con acetato de etilo y n-propanol tratado con los hongos saprobios produjo cantidades considerables de actividad lacasa cuando fue inoculado con *Py. cinnabarinus*, en cambio con *C. rigida* y *T. versicolor* se observaron niveles muy bajos o nulos de actividad (Fig. 23A y B). Tras la inoculación con los hongos saprobios la actividad lacasa detectada en el alpeorujo extractado con metanol fue muy alta en el caso de *C. rigida* mientras que *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* mostraron valores muy pequeños o incluso no se detectó esa actividad (Fig. 23C). El alpeorujo extractado con agua I no tuvo apenas actividad lacasa tras la inoculación con los hongos saprobios (Fig. 23D).

La actividad Mn peroxidasa del extracto de acetato de etilo fue mayor en el caso de incubaciones con *T. versicolor* mientras que, en el caso del alpeorujo extractado con n-propanol, se detectó niveles similares de esta actividad en incubaciones con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus*. No se detectó actividad Mn peroxidasa en el alpeorujo extractado con n-propanol en presencia de *T. versicolor* (Fig. 23A y B). En el alpeorujo extractado con metanol la actividad Mn peroxidasa fue muy elevada en el caso de *C. rigida* mientras que *Py. cinnabarinus* y *T. versicolor* mostraron niveles considerablemente inferiores (Fig. 23C). *C. rigida* y *T. versicolor* fueron los hongos más efectivos en la producción de actividad Mn peroxidasa en el alpeorujo extractado con agua I (Fig. 23D).

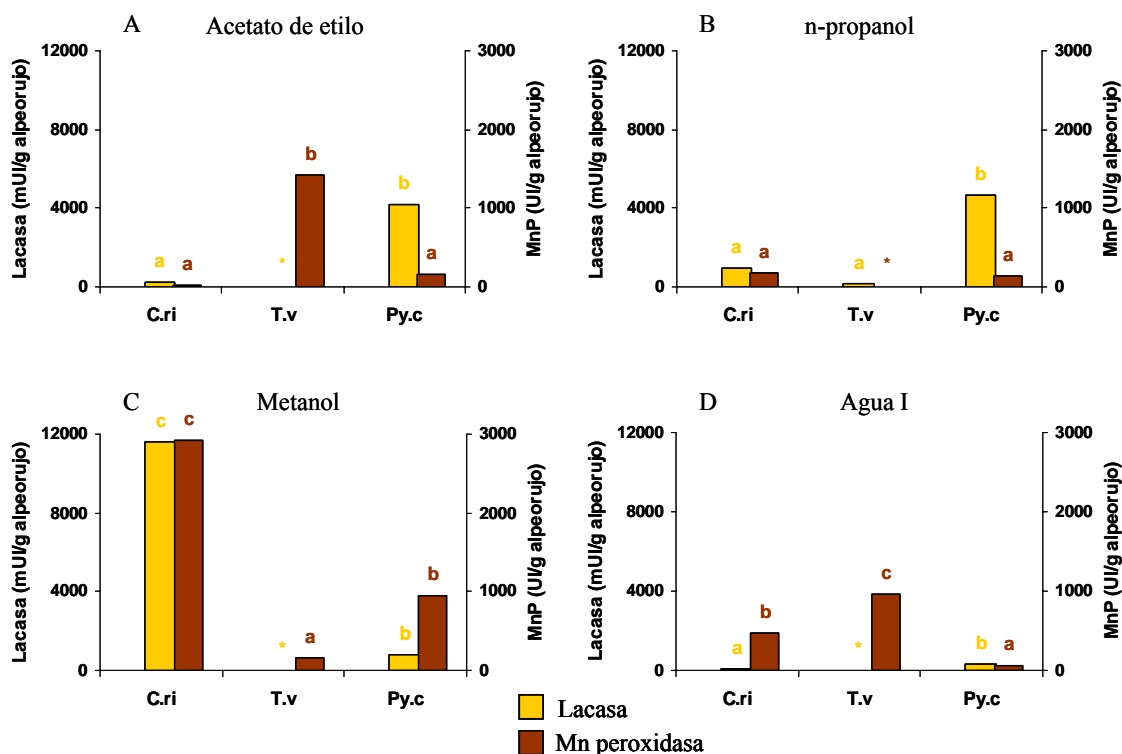


Fig. 23. Actividad lacasa y Mn peroxidasa del alperujo extractado con acetato de etilo (A), n-propanol (B), metanol (C) y agua I realizados con soxhlet inoculado con los hongos saprobios *C. rigida* (C.ri), *T. versicolor* (T.v) y *Py. cinnabarinus* (Py.c). Las letras distintas en cada barra para cada alperujo extractado y actividad enzimática indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$). *= actividad no detectada.

Decoloración del alperujo

Objetivo

La coloración oscura del alperujo se debe principalmente a los taninos y otros fenoles, compuestos muy recalcitrantes que provocan la fitotoxicidad de este residuo. Se ha descrito que la pérdida de color de dicho residuo por métodos tanto físicos como biológicos podría implicar la disminución de la toxicidad del alperujo. El fraccionamiento con agua de alperujo es el más efectivo para la extracción de los elementos que causan su coloración oscura. Mediante este ensayo se pretende observar

el potencial de decoloración de los extractos acuosos de alpeorujos por los hongos objeto de estudio para poder relacionarlo con su capacidad de detoxificación.

Materiales y métodos

Este ensayo se realizó con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* cultivados durante 52 días en medios MEA y agar a los que se les añadieron 5, 25 y 50% del extracto agua III de alpeorujos (Esquema 3). A lo largo del periodo de crecimiento de los hongos se determinó el grado de decoloración del medio midiendo la absorbancia del mismo en tres zonas distintas de la placa. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Resultados

Los resultados de este ensayo muestran como la decoloración del extracto agua III de alpeorujos por *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* fue mayor en aquellos medios con agar que con MEA (Fig. 25A y B) mientras que en el caso de *T. versicolor* sucedió al contrario (Fig. 25C). *T. versicolor* fue el hongo más eficaz en la decoloración del alpeorujos en medios con cantidades pequeñas de extracto acuoso de este, en cambio en el caso de *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* este efecto no fue tan patente. En cuanto al tiempo de decoloración *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* comenzaron a decolorar manifiestamente el extracto de alpeorujos a los 10 días de cultivo mientras que *T. versicolor* necesitó 21 días para decolorar. El hongo que más decoloración produjo en el medio fue *T. versicolor* alcanzando diferencias de 35 unidades de densidad óptica a los 52 días de crecimiento en medio MEA con un 5% de extracto acuoso.

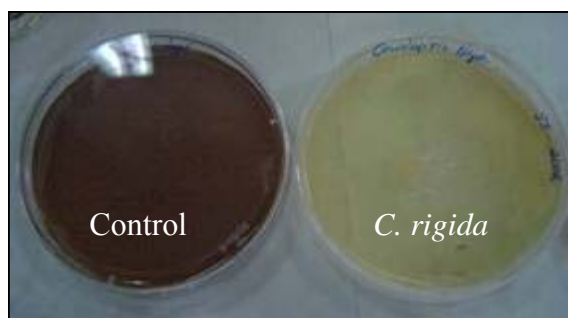


Fig. 24. Decoloración del medio agar al que se añadió 5% de extracto agua III de alpeorujos por el hongo *C. rigida*.

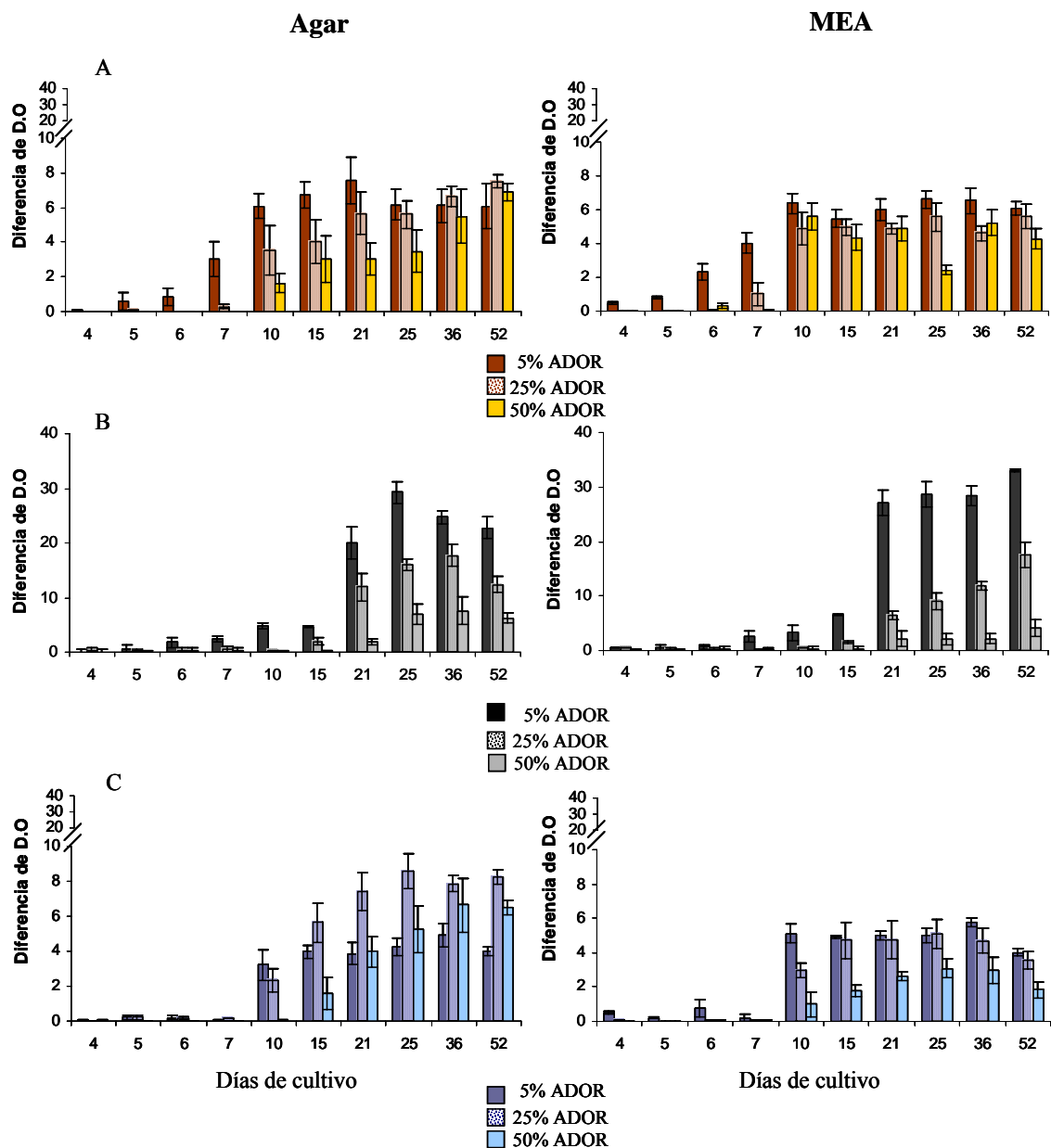


Fig. 25. Decoloración del medio agar o MEA al que se añadió 5, 25 y 50% de extracto agua III de alpeoruj por los hongos *C. rigida* (A), *T. versicolor* (B) y *Py. cinnabarinus* (C) durante diferentes días de cultivo. Las barras en cada columna indican la desviación estándar de cada muestra.

Discusión

La extracción orbital de alpeoruj más efectiva en cuanto a extracción fenólica se refiere fue la extracción acuosa (Agua I) ya que teniendo en cuenta que el alpeoruj presenta un contenido fenólico total de 22,19 g/kg de alpeoruj, mediante dicha

extracción se obtuvo un 83% de dicho contenido. El extracto acuoso es la fracción del alpeorujó que contiene todas las sustancias solubles del mismo, incluyendo fenoles y azúcares, y es la forma más parecida al alpechín. La extracción de alpeorujó con acetato de etilo y después con agua (Agua II) muestra como el contenido fenólico fue menor al obtenido en una extracción acuosa normal, lo que confirma que los fenoles que se extraen con el acetato de etilo también están presentes en el extracto acuoso (Agua I), incluso la suma de fenoles extraídos con el acetato de etilo y acetato de etilo y después con agua dan como resultado el total obtenido con la extracción Agua I. Tal y como se observa en los ensayos de fitotoxicidad con semillas de berro, los extractos orbitales más fitotóxicos fueron el extracto acuoso (Agua I) y el extracto que se hizo previamente con acetato de etilo y después con agua (Agua II), pudiendo atribuirse la mayor toxicidad a su contenido fenólico. A pesar de mostrar menor contenido fenólico respecto al extracto acuoso I, el extracto de agua II mostró una fitotoxicidad bastante similar a la del agua I lo cual podría indicar que los fenoles fitotóxicos no se extrajeron de una forma eficaz mediante extracción orbital con acetato de etilo.

Las extracciones de alpeorujó con acetato de etilo, bien directamente del alpeorujó (acetato de etilo I) o a partir de un extracto acuoso de alpeorujó (acetato de etilo II) mostraron los valores más bajos de fenoles con cantidades bastante similares entre dichos extractos a pesar de ser extracciones diferentes. Esto podría indicar que la insolubilidad del extracto de acetato de etilo I en agua dada su naturaleza apolar, impide la medida real de la cantidad de fenoles. Se ha descrito que los fenoles más fitotóxicos del alpechín son aquellos presentes en la fracción de acetato de etilo que son fenoles de bajo peso molecular (Capasso *et al.*, 1992). De hecho, estudios realizados por Della Greca *et al.* (2001) e Isidori *et al.* (2005) mostraron que los fenoles más tóxicos del alpechín correspondieron a aquellos que poseen un bajo peso molecular (< 350 Da) como el catecol, el hidroxitirosol y ácidos cinnámicos mientras que aquellos que tenían un peso molecular entre 1000 y 20000 Da llegaban incluso a mostrar un efecto estimulador. Los constituyentes fenólicos fundamentales que detectamos en el alpeorujó, fueron el p-tirosol y el hidroxitirosol, ambos de bajo peso molecular, y que parecen jugar un papel importante en la fitotoxicidad. Algunos autores han observado que fenoles como el p-tirosol muestran una gran fitotoxicidad de forma inespecífica en las plantas mientras que el hidroxitirosol mostró fitotoxicidad solamente en plantas de tomate, además fenoles como el p-tirosol pueden mostrar efectos sinérgicos con otros fenoles potenciando la fitotoxicidad (Capasso *et al.*, 1992). El análisis mediante HPLC

del extracto de acetato de etilo confirmó que con este solvente se extraen fundamentalmente fenoles monoméricos como el ácido protocatecuico, hidroxitirosol, protocatecol, p-tirosol, ácido vainílico, ácido p-cumárico, monoacetil hidroxitirosol y oleuropeina. Los fenoles encontrados coinciden con los detectados por otros autores en residuos de la aceituna aunque no se encontraron ácido ferúlico y vainillina, fenoles que si se habían detectado previamente en el alpeorujo (Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Casa *et al.*, 2003). La ausencia o presencia de determinados compuestos fenólicos en los distintos residuos procedentes de la aceituna se atribuye generalmente a la variabilidad de este residuo en cuanto a condiciones climáticas durante el cultivo del olivo, variedad y grado de maduración del fruto, prácticas agronómicas o proceso de extracción utilizados (Morelló *et al.*, 2004). Estudios de Artajo *et al.* (2006) muestran como puede variar la presencia de los diferentes fenoles en el alpechín, orujo y aceite de oliva en función del riego, observando que los fenoles simples son los que más varían. En nuestros ensayos se observó que el extracto de acetato de etilo I mostró la menor toxicidad de todos los extractos debido posiblemente a la dificultad de solubilización del extracto tanto para su aplicación a las semillas como para las determinaciones bioquímicas. A pesar de la baja cantidad de fenoles del extracto de acetato de etilo II, los efectos fitotóxicos en las semillas de berro fueron mayores que los efectos producidos por el acetato de etilo I, y similares a los extractos metanólico y acuoso cuando ambos se aplicaron en concentraciones altas. Teniendo en cuenta que la cantidad de fenoles en el extracto de acetato de etilo a partir de un extracto acuoso (Acetato de etilo II) es mucho menor que en el extracto acuoso y metanólico y que a pesar de ello muestran fitotoxicidad similar se podría pensar que existe una relación entre la fitotoxicidad y los fenoles solubles de naturaleza apolar no extractables con acetato de etilo directamente. Este hecho unido a la insolubilidad del extracto de acetato de etilo I, que hace que este no afecte negativamente a las semillas, apoya que dicho extracto mostrara la menor fitotoxicidad. Algunos estudios revelan que la fitotoxicidad del alpeorujo es debida fundamentalmente a las sustancias solubles en agua, sin embargo otros constituyentes como ácidos grasos volátiles, aldehídos y alcoholes también se conocen por ser fitotóxicos (Komilis *et al.*, 2005).

El extracto metanólico recuperó un 42% de los fenoles presentes en el alpeorujo. Al igual que otros autores (Sampedro *et al.*, 2004a) detectamos como fenoles mayoritarios del extracto metanolico el hidroxitirosol y p-tirosol. Este extracto extrajo

la mitad de fenoles que el agua I y además fue menos fitotóxico que éste lo cual manifiesta la relación existente entre la fitotoxicidad y el contenido fenólico.

A pesar de que el fraccionamiento físico mediante soxhlet es considerado como el más eficaz en la extracción de sustancias (Mulinacci *et al.*, 2005), en nuestros ensayos solo se manifestó este hecho en la extracción con acetato de etilo. La cantidad de fenoles del extracto acuoso obtenido mediante soxhlet (Agua III) fue similar a la obtenida por el mismo extractante realizado con agitación orbital (Agua I) de modo que posiblemente esté teniendo lugar un fenómeno de saturación y por ello el método extractivo no consigue aumentar su eficacia. El extracto acuoso realizado en soxhlet (Agua III) mostró la mayor fitotoxicidad de todos los extractos a concentraciones altas, siendo incluso más fitotóxico que el mismo extracto realizado de una forma orbital (Agua I) lo que hace pensar en una posible transformación de los componentes de dicho extracto a nivel químico o una mayor extracción de sustancias fitotóxicas. El extracto con acetato de etilo y después con agua realizado en soxhlet (Agua II) mostró un contenido fenólico y glucídico menor que el obtenido con los mismos extractantes mediante agitación orbital pero hay que tener en cuenta que la extracción con acetato de etilo utilizando soxhlet extrajo mayor cantidad de fenoles que con el sistema orbital. Por ello en el extracto acuoso realizado después de la extracción con acetato de etilo mediante soxhlet (Agua II), la fitotoxicidad fue inferior a la del extracto acuoso (Agua III) ya que se eliminó la fracción que aporta fitotoxicidad al extracto, es decir, la fracción fenólica de acetato de etilo. La fitotoxicidad del extracto acuoso realizado con soxhlet (Agua II) a su vez fue inferior a la del mismo extracto realizado con la técnica orbital dado su menor contenido fenólico.

Observando la secuencia de fracciones obtenidas mediante la extracción en soxhlet, la cantidad de fenoles extraídos con acetato de etilo y propanol fue similar, pero no la tipología de los mismos, en el acetato de etilo se extrajeron principalmente fenoles simples y ácidos fenólicos mientras que en el extracto n-propanol predominaron los compuestos de tipo flavonoide y secoiridoide con restos de algunos ácidos fenólicos y fenoles simples. A esta distinta composición pueden deberse las diferencias en cuanto a fitotoxicidad ya que a pesar de mostrar la misma concentración fenólica en ambos extractos, los fenoles presentes en el acetato de etilo mostraron una mayor fitotoxicidad que los fenoles del extracto propanólico. Estos resultados se corresponden con estudios anteriores que afirman que la fitotoxicidad del alpeorujó se relaciona con los fenoles de bajo peso molecular y ácidos fenólicos (Capasso *et al.*, 1992; Della Greca *et al.*, 2001).

Los principales fenoles detectados en el extracto de acetato de etilo mediante soxhlet fueron ácido protocatecuico, hidroxitirosol, p-tirosol, ácido dihidroximandélico, ácido vainílico, ácido tetrahidroximandélico, ácido p-cumárico y monoacetil hidroxitirosol. Estos resultados confirman la eficiencia del acetato de etilo en la recuperación de los componentes de bajo peso molecular de los residuos del aceite de oliva (Visioli *et al.*, 1999), aunque también se extrajeron fenoles más complejos como el ácido elenólico, forma dialdehídica de la dicarboximetil oleuropeina aglicona oxidada, oleuropeina, ligustrósido y luteolina. Los compuestos detectados en el extracto de acetato de etilo de alpeorujó obtenido mediante soxhlet fueron similares a los detectados en otros estudios anteriores de alpeorujó en los que se comprobó que el hidroxitirosol fue el componente mayoritario de este residuo (Lesage-Meesen *et al.*, 2001). Se observó sin embargo una mayor tipología de fenoles en este extracto respecto a los observados en el extracto de acetato de etilo realizado con extracción orbital, principalmente en aquellos de mayor peso molecular como flavonoides y secoiridoides. En el extracto de acetato de etilo de alpeorujó realizado con soxhlet se encontraron nuevos picos que no correspondían a ningún compuesto detectado en alpeorujó hasta el momento como el ácido dihidroximandélico y el tetrahidroximandélico cuya presencia fue sugerida por primera vez en alpechín por Ramos-Cormenzana *et al.* (1996). Además se encontró el pico 11 con un tiempo de retención en el UV a 50,85 min y una relación m/z en el espectro de masa de 335 tras su análisis MS/MS, que podría corresponder al producto de oxidación de la forma dialdehídica de la dicarboximetil oleuropeina aglicona, compuesto encontrado en la oxidación del aceite de oliva virgen (Ríos *et al.*, 2005).

El extracto propanólico se caracterizó por tener una cantidad de fenoles similar al extracto de acetato de etilo, formado principalmente por flavonoides y secoiridoides y con cantidades bajas de azúcares. El n-propanol es un solvente con capacidad para extraer algunos de los fenoles que extrae el acetato de etilo (Rodríguez *et al.*, 1988). La fitotoxicidad de este extracto fue levemente inferior a la del extracto de acetato de etilo lo que indica que los fenoles fitotóxicos no son exclusivamente los fenoles monoméricos y ácidos fenólicos. Los fenoles comunes al extracto de acetato de etilo fueron pequeñas cantidades de ácido protocatecuico, hidroxitirosol, oleuropeina y luteolina que posiblemente quedaron en el alpeorujó sin extraer. También se extrajeron nuevos compuestos como el hidroxitirosol glucósido junto con un oleósido, oleuropeina aglicona, ácido 3,4,5 trimetoxibenzoico, luteolina-glucósido y luteolina rutinósido. Se

detectó además el 6' β -ramnopiranosil-oleósido, un derivado del oleósido detectado en aceitunas por Cardoso *et al.* (2005) que se ha descrito por primera vez en residuos del olivar. El p-tirosol, compuesto al que se ha relacionado con los efectos fitotóxicos, no apareció en el extracto propanólico, además estudios de Nandakumar *et al.* (1985), comprobaron que los flavonoides inhiben la germinación de las semillas sino que promueven incluso el desarrollo de semillas de tomate, por lo tanto, cabe pensar que los causantes de la fitotoxicidad de este extracto podrían ser el hidroxitirosol y los ácidos fenólicos (protocatecuico y 3,4,5 trimetoxibenzoico) junto con los oleósidos.

El extracto metanólico obtenido tras la extracción secuencial con acetato de etilo, n-propanol y metanol no mostró fitotoxicidad a partir de concentraciones del 20%. Se detectaron prácticamente el mismo tipo de fenoles en el extracto metanólico que en el propanólico pero en menor concentración a lo que puede deberle la inferior fitotoxicidad. Cabe destacar que en el extracto metanólico no apareció el ácido 3,4,5 trimetoxibenzoico, pudiendo relacionarse la menor fitotoxicidad con la ausencia de este compuesto. No obstante la fitotoxicidad que detectamos en el extracto metanólico puede deberse a la presencia de los fenoles comunes al resto de extractos como el ácido protocatecuico, hidroxitirosol y los oleósidos. En este extracto se determinó otro nuevo compuesto no determinado hasta ahora en alpeorujos, el 6' β -glucopiranosil-oleósido, otro derivado del oleósido también detectado en aceitunas aunque todavía no se conoce su función sobre plantas (Cardoso *et al.*, 2005).

El extracto acuoso I resultado de la extracción secuencial con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua fue el menos fitotóxico de toda la secuencia a pesar de contener la mayor concentración de fenoles detectados colorimétricamente, esto puede deberse a que los fenoles más tóxicos se han eliminado en las fracciones anteriores como son los fenoles monoméricos y ácidos fenólicos tal y como muestra su cromatograma. A pesar de la alta cantidad de fenoles determinados mediante métodos colorimétricos prácticamente no se detectaron fenoles en los cromatogramas obtenidos mediante HPLC, quedando solo bajísimas cantidades de hidroxitirosol y su glucósido, secoiridoides, flavonoides glicosilados y verbascósido que no serían los responsables de la fitotoxicidad. De hecho el extracto acuoso III de alpeorujos fue altamente fitotóxico a pesar de mostrar una cantidad de fenoles levemente superior al extracto acuoso I, ya que los fenoles extraídos en etapas secuenciales anteriores pueden ser los responsables de la fitotoxicidad del alpeorujos. Se demostró la presencia en dicho extracto de la polimerina, conjunto de fenoles similares a los que forman el complejo húmico junto con metales,

carbohidratos, melanina y proteínas, que parece ser el responsable de la coloración de alpechines y alpeorujos y posible causante de una alteración en la detección colorimétrica (Capasso *et al.*, 2002; Capasso *et al.*, 2004). Esto podría indicar que la técnica colorimétrica para detectar los fenoles del alpeorujos no es adecuada ya que el color del residuo enmascara la medida espectrofotométrica, por lo que la cantidad de fenoles presentes en el extracto agua I no serían en realidad fenoles, resultados que explicarían porque no se observa relación, en la mayoría de los casos entre el supuesto contenido de fenoles en el alpeorujos y la fitotoxicidad del mismo. Se ha sugerido cuantificar los fenoles mediante técnica del HPLC pero esta técnica resulta difícil de aplicar con alpeorujos.

Tras las extracciones del alpeorujos mediante extractor rotativo orbital, se obtuvieron unos alpeorujos extractados que de forma general redujeron la fitotoxicidad respecto al alpeorujos sin extractar. Tras la extracción con agua (Agua I) el sólido extractado mostró solo un 35% de los fenoles totales presentes en el alpeorujos, lo cual indica que el agua, aunque extrae gran cantidad de fenoles, no es suficiente para la eliminación total de estos, bien porque no todos los fenoles son solubles en agua o bien porque se producen interferencias de la coloración característica de los alpechines y alpeorujos y enmascara el resultado del contenido fenólico final. Aún con esta eliminación fenólica el alpeorujos sigue siendo fitotóxico lo cual indica que los fenoles siguen estando presentes a una concentración tóxica para la planta o que siguen quedando compuestos que causan fitotoxicidad.

En el sólido extractado con los solventes acetato de etilo y agua (Agua II) se observó un descenso alto en el contenido fenólico y glucídico del 62% y 85% respectivamente, con respecto al alpeorujos sin extractar. Este descenso elevado en el contenido fenólico y glucídico no se manifestó en el descenso de la fitotoxicidad, de manera que la reducción del peso seco de las plantas de tomate fue bastante similar al del alpeorujos extractado con agua I. Con esta extracción se eliminó mayor cantidad de azúcares que con la extracción de agua I con lo cual, cabe pensar que el incremento de azúcares extraídos respecto a la extracción con agua I se deben al acetato de etilo, que extraería glucofenoles y por lo tanto disminuiría la carga glucídica total.

El sólido resultante de la extracción orbital con acetato de etilo mostró un contenido fenólico bastante similar a los del alpeorujos sin extractar con un 99% de fenoles. Efecto similar se observó en el contenido total de azúcares, de manera que la cantidad que quedó en el alpeorujos extractado (95 mg/g de alpeorujos), fué

prácticamente igual a la que se observó en el alpeorujito sin extraer (100 mg/g de alpeorujito). Cabe esperar que si existe relación entre el contenido fenólico y la fitotoxicidad de dicho residuo, este alpeorujito extraído debería tener prácticamente la misma fitotoxicidad que el alpeorujito sin extraer, en cambio mostró una fitotoxicidad mayor, posiblemente debido a la permanencia en el alpeorujito extraído de restos del solvente que pudieran resultar tóxicos para las plantas. En ocasiones los tratamientos físicos en los que se emplean solventes químicos pueden dejar restos más recalcitrantes que los del efluente original (Mantzavinos y Kalogerakis, 2005). Algo similar en cuanto a fitotoxicidad y contenido fenólico ocurrió en el alpeorujito extraído con metanol en el cual quedaron un 72% de fenoles y un 50% de azúcares y fue el alpeorujito extraído que más disminuyó el crecimiento de las plantas de tomate a la menor dosis de residuo aplicado, a pesar de contener menor cantidad de fenoles que el alpeorujito extraído con acetato de etilo. Estos resultados indican que la extracción orbital de alpeorujito con solventes orgánicos no es adecuada para eliminar la fitotoxicidad del residuo.

Cuando el alpeorujito se extraía secuencialmente mediante Soxhlet, el alpeorujito extraído con acetato de etilo mostró ser un residuo rico en azúcares y con una cantidad de fenoles detectados levemente inferiores a su control no extraído. Posiblemente la coloración oscura de este residuo no permite detectar de una forma adecuada los fenoles que realmente se eliminaron durante el proceso extractivo con acetato de etilo, dado que este solvente es un potente extractor de fenoles. Sin embargo la eliminación de los ácidos fenólicos y fenoles monoméricos mediante la extracción con acetato de etilo provocó un descenso en la fitotoxicidad del alpeorujito. Esto confirma que los fenoles eliminados mediante la extracción de acetato de etilo son responsables de la fitotoxicidad del alpeorujito.

El contenido fenólico del alpeorujito extraído secuencialmente con n-propanol después del acetato de etilo fue menor que el alpeorujito extraído solo con acetato de etilo al ser un proceso secuencial. Se trata de un residuo sin ácidos fenólicos, flavonoides, secoiridoides y con una carga glucídica menor. Este alpeorujito mostró una fitotoxicidad menor que el extraído con acetato de etilo con lo que cabe pensar que los fenoles extraídos con n-propanol también son responsables de la fitotoxicidad del alpeorujito.

El sólido extraído con metanol después de la extracción secuencial con acetato de etilo y n-propanol no resultó fitotóxico a la menor dosis aplicada pudiendo por tanto considerarse que una extracción secuencial con los solventes mencionados constituye

una herramienta básica para la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujó. El último residuo obtenido en la extracción secuencial de alpeorujó extractado con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua no solo no resultó fitotóxico a la dosis aplicada sino que tuvo un efecto potenciador de la germinación de semillas de berro con lo cual solamente el tratamiento físico de alpeorujó sirvió para eliminar su fitotoxicidad. Posiblemente los fenoles que quedaron en estos residuos (Metanol y Agua I) tras la extracción, no son los responsables de la fitotoxicidad de estos sustratos.

Los hongos saprobios crecieron de forma óptima y desarrollaron gran cantidad de biomasa cuando se cultivaron en extracto acuoso de alpeorujó. El extracto acuoso de alpeorujó es una fracción que contiene gran cantidad de fenoles y azúcares y la más parecida al alpechín. Al ser una fracción muy rica en azúcares puede ser un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de los hongos (Galli *et al.*, 1988), ya que, como es sabido, los hongos saprobios se nutren de materia orgánica utilizando los azúcares y componentes orgánicos como fuente de carbono y energía (Fell *et al.*, 2001).

El contenido fenólico del extracto acuoso de alpeorujó extractado con agitación orbital (Agua I) disminuyó con los hongos ligninolíticos *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Se observó que estos dos hongos produjeron en este extracto gran cantidad de lacasa y Mn peroxidasa, enzimas con un papel muy importante en la degradación de los compuestos fenólicos de residuos del aceite de oliva (Tsioulpas *et al.*, 2002). Si bien se ha demostrado que *T. versicolor* es capaz de producir LiP, MnP y lacasa en cultivos tanto sólidos como líquidos (Johansson y Nyman, 1993; Elisashvili *et al.*, 2001; Moldes *et al.*, 2004), algunos autores han encontrado que *Py. cinnabarinus* no es capaz de producir MnP ni LiP en condiciones de ligninólisis ya que produce lacasa en su metabolismo primario, sin embargo, al igual que en el alpechín, un medio como el extracto acuoso de alpeorujó podría propiciar la liberación de este enzima (Eggert, 1996; Geng y Li, 2002).

Observando los cambios producidos en la composición química durante el proceso de incubación y los mecanismos de eliminación de la fitotoxicidad del extracto acuoso (Agua I) se pudo comprobar que los dos hongos ligninolíticos eliminaron principalmente el hidroxitirosol de forma concomitante con un aumento en el índice de germinabilidad de semillas de berro, lo cual podría indicar una relación directa del hidroxitirosol con la fitotoxicidad.

Aunque ciertas especies del genero *Penicillium* poseen la capacidad para producir enzimas ligninolíticas (Yu *et al.*, 2005) y para metabolizar fenoles (Hofrichter y Scheibner, 1993; Hofrichter *et al.*, 1995), el hongo saprobio del suelo *P. chrysogenum*-10 no mostró estas actividades en el extracto acuoso de alpeorujó (Agua I), no descendió cuantitativamente el contenido de fenoles. Sin embargo se observó una pérdida de p-tirosol y una eliminación de la fitotoxicidad del extracto acuoso, pudiendo relacionar el papel del p-tirosol en la fitotoxicidad. Sí se observó en cambio una actividad hidrolítica muy elevada del extracto acuoso de alpeorujó incubado con este hongo. Algunos enzimas hidrolíticos que degradan las paredes celulares de las plantas parecen estar implicadas en la detoxificación de los residuos del olivar (Benítez *et al.*, 2002).

Saparrat *et al.* (2002) han encontrado que *C. rigida* produce principalmente lacasas y no han detectado la actividad MnP. Sin embargo en nuestro ensayo la producción de lacasa por *C. rigida* en extracto acuoso de alpeorujó fue muy baja. La ausencia o baja producción de enzimas degradadoras de fenoles y de enzimas hidrolíticos puede explicar porque *C. rigida* sólo fue capaz de disminuir la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó cuando este se aplicó a concentraciones muy bajas.

En el extracto de alpeorujó realizado con acetato de etilo y después con agua mediante extracción orbital (Agua II) los hongos ligninolíticos *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* fueron los únicos capaces de disminuir el contenido fenólico debido a la producción elevada de actividad lacasa y Mn peroxidasa, sin embargo solo *T. versicolor* redujo la fitotoxicidad de este residuo. *C. rigida* no mostró una reducción cuantitativa de fenoles pero si cualitativa al eliminar el hidroxitirosol del extracto acuoso (Agua II) y a su vez redujo la fitotoxicidad de dicho extracto con lo cual cabría apuntar de nuevo a que el hidroxitirosol está implicado en la fitotoxicidad del alpeorujó.

Todos los hongos empleados crecieron en el extracto de acetato de etilo I suplementado con un medio Czapek sin sacarosa, aunque *P. chrysogenum*-10 mostró menor crecimiento posiblemente por su incapacidad para metabolizar la mayoría de los fenoles extraídos. *C. rigida* y *T. versicolor* sí eliminaron gran parte de los fenoles del extracto de acetato de etilo I, entre ellos el hidroxitirosol y p-tirosol gracias a la producción de enzimas lacasa y Mn peroxidasa. La producción de enzimas ligninolíticas e hidrolíticas durante el metabolismo de *Py. cinnabarinus* eliminó el hidroxitirosol del extracto de acetato de etilo. La fitotoxicidad de este extracto solamente se redujo por *T. versicolor*, llegando a eliminarla a concentraciones inferiores a 10% por lo que en este

caso no se constató una relación entre la disminución cuantitativa del contenido fenólico y la reducción de la fitotoxicidad. Algunos autores han visto que cuando se trata el alpechín con determinados hongos se produce una disminución del contenido fenólico sin corresponderse con un descenso en la fitotoxicidad, efecto que se atribuye a la formación de fenoxi-radicales y otros compuestos quinoides durante la oxidación que son más fitotóxicos que los fenoles originales (Martirani *et al.*, 1996; Tsioulpas *et al.*, 2002). El contenido en azúcares extraído con el acetato de etilo fue ínfimo dadas las características de las moléculas glucídicas respecto a la apolaridad del solvente, a pesar de ello se observó una leve reducción por *T. versicolor* y *C. rigida* a pesar de que las actividades enzimáticas hidrolíticas observadas fueron muy bajas.

El extracto metanólico extrajo un 42% de los fenoles presentes en el alpeorujo que se redujeron con el tratamiento de los hongos saprobios estudiados. La reducción de fenoles entre ellos el hidroxitirosol y p-tirosol fue máxima en la incubación con *Py. cinnabarinus*, gracias a una gran actividad lacasa y Mn peroxidasa. A pesar de estos resultados este hongo solo eliminó la fitotoxicidad del extracto metanólico en proporciones bajas de extracto. El extracto metanólico fue el extracto más fitotóxico después del extracto acuoso. *P. chrysogenum*-10 fue el hongo que más fitotoxicidad eliminó a dosis intermedias de extracto aplicado posiblemente por la producción de endopolimetilgalacturonasa como consecuencia de su metabolismo.

El extracto de acetato de etilo a partir del extracto acuoso de alpeorujo obtenido en decantador (Acetato de etilo II) fue el extracto más pobre en azúcares y en fenoles, a pesar de ello y de no añadir ninguna fuente nutritiva adicional, los hongos fueron capaces de crecer en dicho extracto, aunque solo modificaron levemente su composición y se detectó escasa actividad enzimática. Algunos autores han observado casos en los que hay modificaciones en el contenido fenólico sin detectar actividad lacasa mostrando la posibilidad de que esta precipite con los polímeros producidos en su reacción (Tsioulpas *et al.*, 2002; Gianfreda *et al.*, 2003). Al igual que el extracto de acetato de etilo I, el de acetato de etilo II es un extracto constituido fundamentalmente por fenoles y entre ellos el hidroxitirosol y p-tirosol que no se modificaron tras la incubación de los hongos saprobios dada la ausencia de actividad ligninolítica. Todos los hongos disminuyeron la fitotoxicidad del extracto cuando se aplicó a la proporción del 5% y tuvo una relación lineal con la cantidad de degradación fenólica, a pesar de la presencia continua del hidroxitirosol y p-tirosol, lo cual podría indicar que estos hongos degradan

otros componentes fenólicos diferentes y/o que el hidroxitirosol y p-tirosol no resultan fitotóxicos a bajas concentraciones.

En los extractos Agua II y III obtenidos con soxhlet, todos los hongos disminuyeron cuantitativamente el contenido fenólico en mayor o menor grado, sin embargo, solamente *T. versicolor* eliminó la fitotoxicidad de ambos extractos. Esta disminución en la fitotoxicidad podría relacionarse con el descenso fenólico producido por este hongo. Las mayores actividades enzimáticas se detectaron en el extracto acuoso III posiblemente por su riqueza en fuentes carbonadas. Como es sabido los fenoles presentes en el alpechín son capaces de inducir la actividad de enzimas como la lacasa y Mn peroxidasa (Giatti *et al.*, 2004) por lo que cabría esperar, como de hecho ocurre, que en este tipo de extractos la continua presencia fenólica provocara la inducción de las enzimas ligninolíticas. Además la producción de este tipo de enzimas parece también estar favorecida por la presencia de carbohidratos solubles (Mikiashvili *et al.*, 2005).

En estos extractos acuosos realizados con soxhlet se observan casos en los que hay una disminución cuantitativa en el contenido fenólico y una eliminación de los fenoles simples por los hongos y en cambio no se observa un descenso de la fitotoxicidad de los extractos. Este hecho podría deberse a que, como algunos autores afirman, las enzimas ligninolíticas producen oxidaciones al azar en el residuo dando como resultado la polimerización de los compuestos sencillos en componentes de un mayor peso molecular que podrán ser más o menos fitotóxicos a pesar de haberse producido un descenso fenólico (Youn *et al.*, 1995).

Los fenoles del extracto de acetato de etilo obtenido en soxhlet disminuyeron tras el tratamiento con todos los hongos ligninolíticos e incluso se produjo una eliminación casi completa de los mismos en el caso de *T. versicolor* que se corresponde con una reducción de su fitotoxicidad. *C. rigida* eliminó prácticamente todos los fenoles del extracto de acetato de etilo producido con soxhlet salvo una leve cantidad de hidroxitirosol y de ácido hidroximandélico y tetrahidroximandélico, datos que se contradicen con estudios previos en alpechín en el que se observó que los o-difenoles se degradaban con mayor facilidad que los monofenoles (D'Annibale *et al.*, 1998). A pesar de la presencia de estos fenoles *C. rigida* eliminó la fitotoxicidad a todas las dosis aplicadas por lo que se deduce que el ácido dihidroximandélico y el tetrahidroximandélico no son los responsables de la fitotoxicidad. Tal y como demuestran los estudios colorimétricos y de HPLC *Py. cinnabarinus* fue el hongo menos efectivo en la degradación fenólica del extracto de acetato de etilo ya que no

degradó el p-tirosol ni uno de los compuestos obtenidos no identificados por lo que se puede pensar que estos productos están implicados en la fitotoxicidad. Se ha descrito que el p-tirosol es uno de los compuestos más recalcitrantes ya que no ha sido capaz de ser degradado por *Py. cinnabarinus* en alpeorujó o por *L. edodes* en alpechín (Sampedro *et al.*, 2004a; Vinciguerra *et al.*, 1995).

En relación con las actividades ligninolíticas pudimos observar que la actividad lacasa en el extracto de acetato de etilo realizado con soxhlet fue similar en los tres hongos ensayados. También se observó una gran actividad Mn peroxidasa y en particular en el hongo *Py. cinnabarinus* lo que induce a pensar que dichas enzimas no degradan el p-tirosol de dicho extracto de un modo efectivo dado el polimorfismo de estas enzimas.

La incubación del extracto propanólico con los hongos ligninolíticos provocó la desaparición de todos los fenoles detectados, salvo con *C. rigida* en el que apareció el ácido dihidroximandélico que, como es sabido, la aparición de nuevos compuestos y radicales puede deberse a las continuas oxidaciones llevadas a cabo por las enzimas lacasa y Mn peroxidasas durante el ataque a la lignina (Youn *et al.*, 1995). A pesar de la presencia del ácido dihidroximandélico este extracto mostró menor fitotoxicidad que el control sin tratar, al igual que ocurrió en el extracto de acetato de etilo con lo que se vuelve a confirmar que el ácido dihidroximandélico no es responsable de la fitotoxicidad del alpeorujó. Además de *C. rigida*, el hongo *T. versicolor* también consiguió disminuir la fitotoxicidad del extracto propanólico a pesar de poseer escasa actividad lacasa y Mn peroxidasa. Es posible que el descenso de fitotoxicidad causada por *T. versicolor* en el extracto propanólico esté relacionada con la producción de endopolimetilgalacturonasa.

C. rigida y *T. versicolor* disminuyeron la fitotoxicidad del extracto metanólico realizado con soxhlet, aplicado a las plantas a altas concentraciones a la vez que desciende su contenido fenólico. *Py. cinnabarinus* no disminuyó la fitotoxicidad a pesar de reducir el contenido fenólico en gran medida por una actividad lacasa elevada, posiblemente los productos de polimerización formados, derivados de la actuación de las enzimas ligninolíticas como son fenoxiradicales o polímeros fenólicos, tienen un tamaño pequeño que permite su acceso al interior de las plantas y por tanto afecta a su desarrollo.

Tras el tratamiento del extracto acuoso I con los hongos saprobios estudiados se detectó solo el gran pico de la mezcla de compuestos inseparables constituida por

secoiridoides y flavonoides glicosilados que puede ser la polimerina. La oxidación de fenoles origina compuestos fenólicos de alto peso molecular (Pometto y Crawford, 1986). Algunos autores afirman que los fenoles simples y los taninos son altamente tóxicos pero biodegradables (Hamdi, 1992) en cambio los compuestos de alto peso molecular responsables del color negro del alpechín son menos tóxicos y no se degradan con facilidad. La transformación de los fenoles por lacasas es menos eficiente con el aumento del peso molecular debido a los sustituyentes y a la posición de los anillos aromáticos respecto a los grupos OH (Gianfreda *et al.*, 1999). Sin embargo aunque se sabe que la biodegradación de los compuestos aromáticos decrece enormemente por polimerización (Kirk *et al.*, 1981), se ha conseguido la transformación del pigmento del alpechín con hongos ligninolíticos (Pérez *et al.*, 1987).

La actividad lacasa detectada tras la incubación del extracto acuoso I fue la menor de todos los extractos acuosos ensayados, posiblemente debido al escaso contenido en fenoles simples de este residuo que provocó una menor inducción de esta o quizá a la posible precipitación del enzima con las moléculas proteicas tras la oxidación (Gianfreda *et al.*, 2003). Según Ruiz *et al.* (2002) la disminución de color, de fenoles y detoxificación del alpechín por lacasas de *Pha. flavido-alba* juega un papel muy importante en la degradación de monómeros, mientras que la Mn peroxidasa está implicada en la degradación del pigmento polimérico del alpechín, en cambio en nuestros resultados no se observó degradación de la polimerina a pesar de contar con una gran actividad Mn peroxidasa

Se observa que todos los hongos redujeron el contenido de fenoles del extracto acuoso I según las medidas colorimétricas quedando una cantidad residual que podrían corresponder, según los cromatogramas obtenidos mediante HPLC, a los fenoles del complejo polimérico, lo cuales no se degradaron. *C. rigida* fue el único hongo que disminuyó la fitotoxicidad del extracto acuoso I mostrando además un efecto fertilizante a ciertas dosis. En cambio *Py. cinnabarinus* y *T. versicolor*, a pesar de reducir el contenido de fenoles medidos por colorimetría en igual proporción a *C. rigida*, no disminuyeron la fitotoxicidad. Este hecho indica que la técnica colorimétrica puede no reflejar el valor real de los fenoles de este extracto debido a interferencias con el color y podría explicar que no haya relación entre cantidad de fenoles eliminados y fitotoxicidad del extracto. Pero por otro lado la ausencia de relación entre el contenido de fenoles del extracto de alpeorujos y la disminución de la fitotoxicidad del mismo podría deberse a que las enzimas ligninolíticas producen oxidaciones al azar dando

como resultado la polimerización de fenoles sencillos en compuestos de un mayor peso molecular y que dependiendo de su tamaño pueden o no atravesar las paredes celulares de las plantas y por tanto intervenir o no en la fitotoxicidad en función de los polímeros formados, difícilmente identificables mediante HPLC de fase inversa. Los productos de reacción de las enzimas ligninolíticas en cada caso podrán ser más o menos fitotóxicos a pesar de haberse producido un descenso fenólico y una eliminación de los fenoles simples (Gianfreda *et al.*, 1999). Incluso, estos resultados podrían indicar que los fenoles no serían las únicas sustancias responsables de la fitotoxicidad.

El proceso de incubación de hongos saprobios en medios sólidos es distinto al de medio líquido por su diferente disponibilidad de los nutrientes. Se ha observado sin embargo que en nuestros ensayos cuando se incubó el alpeorujó extractado con agua (Agua I) realizado con extracción orbital, durante 20 semanas con los hongos seleccionados se observó que ambos disminuyeron el contenido inicial de fenoles. Este hecho puede deberse a la presencia de enzimas lacasa y Mn peroxidasa aunque en el caso de esta última con niveles de actividades no demasiado altos. Como se sabe que la MnP es un enzima que se inhibe con la agitación (Kirk *et al.*, 1978), el hecho de que en nuestros ensayos el proceso de incubación fuera estático podría justificar esta menor actividad. La fitotoxicidad en cambio mostró un comportamiento diferente ya que a pesar de que los alpeorujos extractados con agua I transformados por los hongos mostraron la misma cantidad de fenoles y entre ellos la misma cantidad de azúcares, *Py. cinnabarinus* fue el único que eliminó la fitotoxicidad del alpeorujó. Estudios de biotransformación de alpeorujó con *Py. cinnabarinus* mostraron que este hongo fue capaz de disminuir el hidroxitirosol y su glucósido a las dos semanas de incubación y que prácticamente eliminó todos los fenoles después de 20 semanas (Sampedro *et al.*, 2004a). Además se observa una relación entre la producción de enzimas hidrolíticas por *Py. cinnabarinus* en el alpeorujó extractado con agua (Agua I) y la eliminación de la fitotoxicidad, lo que induce a pensar que compuestos presentes en el alpeorujó, como restos de paredes celulares (oligosacáridos) y proteínas pueden también afectar negativamente el crecimiento de las plantas (Bucheli *et al.*, 1990). El hecho de que *P. chrysogenum*-10 no eliminara la fitotoxicidad del alpeorujó extractado, a pesar de disminuir la cantidad de fenoles, puede atribuirse a la posible liberación de metabolitos secundarios por *P. chrysogenum*-10 como estrategia competitiva cuando este se cultiva

en un medio con menor cantidad de azúcares, que pueden inhibir el crecimiento de las plantas de tomate.

En el sólido resultante de la extracción orbital con acetato de etilo y metanol se apreció una disminución del contenido fenólico tras la esterilización del residuo. Es sabido que el proceso de esterilización del alpeorujo causa alteraciones físico-químicas de los compuestos como la oxidación y precipitación de fenoles y compuestos quinoides (Aggelis *et al.*, 2003), de hecho se ha observado una precipitación del 25% de los fenoles tras el proceso de esterilización (Fountoulakis *et al.*, 2002). Los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10 y *Py. cinnabarinus* disminuyeron en la misma proporción el contenido fenólico y glucídico del alpeorujo extractado con acetato de etilo mediante extracción orbital. Los basidiomicetos ligninolíticos no son los únicos hongos capaces de degradar compuestos fenólicos sino que se han descrito numerosos hongos filamentosos del género *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* que presentan esta habilidad para degradar fenoles por medio de actividades fenoloxidasas y catecol 1,2 dioxigenasa (Santos y Linardi, 2004). En estos alpeorujos incubados con ambos hongos se observó una elevada producción de actividades Mn peroxidasa que puede estar implicada en la degradación de los fenoles, pero también se observó nula o escasa actividad lacasa. También se observó que ambos hongos producían enzimas hidrolíticas, sin embargo el nivel de actividad enzimática fue diferente para ambos ya que *P. chrysogenum*-10 mostró mayor actividad que *Py. cinnabarinus*. De nuevo se aprecia una relación entre la producción de enzimas hidrolíticas y el descenso de la fitotoxicidad de los alpeorujos tratados con los hongos.

En el alpeorujo extractado de forma orbital con acetato de etilo y a continuación agua (Agua II), los hongos empleados disminuyeron fenoles principalmente mediante la producción de la actividad Mn peroxidasa aunque también puede estar implicada en menor medida la actividad lacasa. También se han detectado niveles altos de actividades endo-GN y endo-XG. A pesar de ello, ninguno de los hongos seleccionados eliminó la fitotoxicidad debido posiblemente a que los productos de transformación de la Mn peroxidasa podrían actuar como posibles agentes fitotóxicos.

En el alpeorujo extractado con metanol, *Py. cinnabarinus* no modificó el contenido fenólico a pesar de producir actividad Mn peroxidasa, en cambio se detectó una gran actividad hidrolítica (endo-GN y endo-XG). Este alpeorujo extractado con metanol e incubado con *Py. cinnabarinus* duplicó el peso seco de las plantas de tomate, con lo cual, se vuelve a dar el caso de descenso de la fitotoxicidad por producción de

enzimas hidrolíticas sin modificación del contenido fenólico. En el caso de incubación de *P. chrysogenum*-10 en alpeorujos extractados con metanol se observa una relación directa entre la disminución de fitotoxicidad y el descenso fenólico de modo que la aplicación de un 5% de alpeorujos extractados con metanol e incubado con este hongo mostró un peso seco de la parte aérea igual al de una planta sin alpeorujos.

La inoculación de los distintos alpeorujos extractados de forma secuencial mediante Soxhlet con *C. rigida* y *Py. cinnabarinus* durante 20 semanas redujo el contenido fenólico en todos los casos salvo en el alpeorujos extractados con todos los solventes de la secuencia (Agua I) en el que ningún hongo modificó su contenido dada la escasez de fenoles (10%). Ambos hongos mostraron producción de lacasa y Mn peroxidasa dependiendo del alpeorujos extractados y *Py. cinnabarinus* mostró una intensa actividad hidrolítica en todos los residuos. Estos dos hongos también fueron los que más redujeron el contenido glucídico debido posiblemente a su mayor crecimiento. Se observó una relación entre el descenso de fenoles por estos hongos y la reducción de la fitotoxicidad en el alpeorujos extractados con n-propanol. En el sólido resultante de toda la extracción secuencial (Agua I) estos dos hongos mostraron un efecto potenciador de la germinación pudiendo relacionar dicho efecto a la actividad hidrolítica de estos hongos dada la ausencia de fitotoxicidad de los controles. Cabe destacar el caso del tratamiento con *T. versicolor*, el cual, en ningún caso produjo una reducción del contenido fenólico dada la escasa producción ligninolítica y sin embargo, los alpeorujos tratados con este hongo fueron los que más potenciaron de forma general la germinación y desarrollo de las semillas. Con lo cual, el efecto fertilizante producido por estos hongos podría atribuirse a la actividad hidrolítica de los mismos, los cuales, al degradar restos de paredes celulares presentes en este tipo de sustratos, implicados según algunos autores en procesos de fitotoxicidad, favorecería la germinación de semillas.

El alpeorujos tal y como lo han indicado numerosos autores no puede aplicarse directamente al suelo como fuente de materia orgánica y mineral ya que sería una fuente de contaminación y tendría un alto impacto medio ambiental, asociado generalmente a su pH ácido, la inhibición que causa en la germinación y el crecimiento de plantas, sus propiedades antimicrobianas y su baja relación C/N (Bonari *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2004). En cambio la extracción física del alpeorujos se muestra, a la luz de los resultados obtenidos, como una vía eficaz para la eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujos y su posible aplicación como fertilizante.

La coloración negra del alpechín ha sido atribuida a la presencia de fenoles principalmente taninos (Assas *et al.*, 2002). Algunos autores han identificado este pigmento como moléculas de catecol-melanina constituida por la polimerización de compuestos fenólicos debido a su oxidación, estando estos unidos a proteínas, ácidos grasos y azúcares (Saiz-Jiménez *et al.*, 1986). Los pigmentos del alpechín se han considerado siempre como sustancias muy recalcitrantes y parecen tener importancia en la toxicidad de alpechines y alpeorujos. Dada la dificultad para caracterizar esta mezcla polimérica usualmente se ha asociado el cambio en la coloración como síntoma de detoxificación y despolimerización (Sayadi *et al.*, 1996). Numerosos autores han descrito una correlación entre el descenso del contenido fenólico total y la decoloración del alpechín (Sayadi y Ellouz, 1992; Dias *et al.*, 1994; Vinciguerra *et al.*, 1995; Ben Hamman *et al.*, 1999). Como es sabido en función del hongo empleado se encuentran diferencias significativas en la disminución del contenido fenólico y el color (Kissi *et al.*, 2001) de hecho en nuestros ensayos *T. versicolor* fue el hongo más eficaz. Además, algunos autores afirman que la concentración de nitrógeno y la naturaleza de la fuente de carbono influyen marcadamente en la decoloración de alpechines por hongos de la podredumbre blanca (Sayadi y Ellouz, 1992). Este hecho se observa en nuestros resultados ya que se produce mayor decoloración del extracto acuoso de alpeorujo por *T. versicolor* en medios que contienen MEA, dada la riqueza de este medio en fuentes nitrogenadas y carbonadas. En cambio también observamos gran decoloración de dicho extracto en medios con agar por *C. rigida* y *Py. cinnabarinus*, en ausencia de una fuente nutricional adicional tal y como encontró Kissi *et al.* (2001). Algunos autores han encontrado un efecto positivo de los azúcares en la decoloración de alpechines por hongos ligninolíticos (Martín y Manzanares, 1994; Sayadi y Ellouz, 1995). Esta reducción en la coloración por *T. versicolor* podría relacionarse con la maquinaria enzimática de este hongo ya que se ha desmostrado la implicación de la lacasa y Mn peroxidasa en la decoloración de alpechines (Sayadi y Ellouz, 1992; Pérez *et al.*, 1998), aunque algunos autores han propuesto además la posibilidad de una absorción de las moléculas cromofóricas por el micelio de estos hongos (Livernoche *et al.*, 1983).

Parece ser que la polimerina, el pigmento detectado en nuestros extractos acuosos no es la responsable de la fitotoxicidad del alpeorujo ya que el extracto agua I no mostró fitotoxicidad. Se ha propuesto este compuesto como un posible fertilizante dada su composición química aunque hasta la fecha no se han comprobado sus efectos fitotóxicos (Capasso *et al.*, 2002). Sus propiedades recalcitrantes se pusieron de

manifiesto, ya que ningún hongo empleado degradó este complejo a los 15 días. Cabe pensar que los estudios de decoloración realizados, en los que asocian una disminución del color con una disminución de la toxicidad, están en relación con la disminución del contenido en el resto de fenoles presentes en el alpechín, los cuales se irían polimerizando y con ello conseguirían disminuir la fitotoxicidad del residuo.

Capítulo IV



*Efecto de alpeorujó transformado por hongos
saprobios sobre el desarrollo de plantas
inoculadas con micorrizas arbusculares*

IV. Efecto del alpeorujó transformado por hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas arbusculares

Objetivo

En este capítulo se pretende estudiar el posible uso del alpeorujó, transformado por hongos saprobios, como fertilizante sobre el desarrollo de plantas de interés agrícola. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares se emplearán con el alpeorujó y sus fracciones transformadas ya que son microorganismos importantes en la biofertilización y biorremediación y que se encuentran de forma natural en el suelo estableciendo simbiosis con las plantas hospedadoras.

4.1. Efecto de fracciones físicas del alpeorujó sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas arbusculares

Materiales y métodos

El experimento se diseñó con tres factores de variación, que fueron la aplicación de alpeorujó, del extracto acuoso de alpeorujó y del alpeorujó extractado con agua. Cada uno de estos factores contenía a su vez dos variables, una variable con tres tratamientos: suelo esterilizado, suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* y suelo no esterilizado. La otra variable fue la aplicación de diferentes dosis del residuo 0, 2,5, 5 y 10%. Los experimentos se realizaron en plantas de tomate y alfalfa con cuatro repeticiones por tratamiento.

Se emplearon semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero. Cuando alcanzaron un tamaño adecuado se transfirieron a macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo:arena (1:1) esterilizado. En aquellos tratamientos con micorrizas se añadió al sustrato 8 g por maceta del inóculo de *G. deserticola*. A los controles no inoculados se les añadió un filtrado de suelo libre de propágulos infectivos. El alpeorujó, extracto acuoso de alpeorujó y alpeorujó extractado con agua obtenidos mediante extracción orbital tal y como se describe anteriormente en el Esquema A1 se

añadieron a las macetas en las proporciones de 0, 2,5, 5 y 10%, mezclando el residuo con la mezcla suelo:arena en el caso de los residuos sólidos. El extracto acuoso de alpeorujos en las diferentes proporciones establecidas se mezcló con agua destilada y se añadió al sustrato hasta completar la capacidad hídrica de campo.

Las plantas se cultivaron en condiciones controladas de invernadero durante 5 semanas. Semanalmente se fertilizaron con 10 ml de solución nutritiva Hewitt, con 5,2 g/l de fósforo para los tratamientos con micorrizas.

Una vez cosechadas las plantas se determinó el peso seco de la parte aérea y de raíz en plantas de tomate y alfalfa después de secarla en estufa durante 48 h a 70 °C. Antes del secado de la raíz ésta se dividió en dos alícuotas: una se tiñó con fuscina para la contabilización del porcentaje de raíz micorrizada y la otra alícuota se empleó para determinar el peso seco relacionando el peso húmedo-peso seco de la alícuota con el peso húmedo total de la raíz.

Resultados

El alpeorujos y las fracciones tanto sólidas como líquidas obtenidas tras la extracción acuosa son fitotóxicas ya que redujeron en líneas generales el peso seco de la parte aérea y de raíz en plantas de tomate (Tabla 1) y alfalfa (Tabla 2). Los efectos fitotóxicos del alpeorujos en las plantas de tomate fueron mayores que los producidos por el extracto acuoso de este y el alpeorujos extractado con agua (Tabla 1). Además el peso de la parte aérea y de raíz de plantas de tomate fue mayor en presencia del extracto acuoso que del alpeorujos extractado con agua. El efecto fitotóxico que produjeron altas dosis de alpeorujos en plantas de tomate en comparación con dosis bajas fue mayor en suelo no esterilizado y suelo inoculado con *G. deserticola* que en suelo esterilizado. Sin embargo, el peso seco de las plantas de tomate a las que se añadió extracto acuoso de alpeorujos fue mayor cuando las plantas crecieron en presencia de *G. deserticola* que cuando crecieron en suelo esterilizado o no esterilizado. La aplicación de 2,5% de extracto acuoso de alpeorujos a plantas de tomate cultivadas en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* incrementó el peso de las plantas de tomate en comparación con los controles cultivados en ausencia de residuo.

Tabla 1. Peso seco de la parte aérea y raíz (mg) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado (SE), suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+Gd) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de alpeorujó (DOR), extracto acuoso de alpeorujó (ADOR) y alpeorujó extractado con agua (SDOR). Las letras distintas en cada columna y números distintos en cada fila para cada tratamiento denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujó (%)	Residuo					
		DOR		ADOR		SDOR	
		Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
SE	0	567 e2	114 d1	576 c2	110 f1	554 de2	120 d1
	2,5	207 c2	41 b1	545 c3	87 e1	578 de3	131 e2
	5	53 a1	14 a1	333 b2	75 de1	305 c2	85 cd1
	10	15 a1 2	4 a1	153 a4	35 ab2	92 ab3	24 ab1 2
SE+G.d	0	843 f2	168 e1	837 e2	172 g1	849 f2	163 e1
	2,5	120 b1	38 b1	960 f3	172 g1	672 e2	146 e1
	5	16 a1	4 a1	648 d4	133 f3	189 abc3	75 c2
	10	17 a1 2	4 a1	315 b4	58 bcd2	123 ab3	25 ab1 2
SNE	0	503 d2	78 c1	501 c2	80 de1	493 d2	73 c1
	2,5	52 a1	8 a1	531 c3	47 bc1	250 bc2	54 bc1
	5	25 a2	3 a1	351 b5	64 cde3	138 abc4	32 ab2
	10	13 a1 2	3 a1	199 a3	19 a1 2	24 a2	5 a1

Los resultados obtenidos muestran que el peso seco de la parte aérea y raíz de las plantas de alfalfa disminuyó cuando se aplicó alpeorujó a todas las dosis empleadas (Tabla 2). La fitotoxicidad del alpeorujó en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* fue menor que la observada en el resto de los suelos ensayados. El fraccionamiento físico del alpeorujó provocó una disminución generalizada de la fitotoxicidad en plantas de alfalfa que fue similar tanto en la fracción sólida como líquida. La aplicación de extracto acuoso de alpeorujó y de alpeorujó extractado sobre suelos esterilizados y no esterilizados redujo el peso seco de las plantas de alfalfa. *G. deserticola* no solo eliminó la fitotoxicidad causada por el extracto acuoso de alpeorujó y el alpeorujó extractado sino que incrementaron el peso de las plantas respecto a los controles a los que no se aplicaron estos residuos.

Capítulo IV

Tabla 2. Peso seco de la parte aérea y raíz (mg) de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivadas en suelo esterilizado (SE), suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+Gd) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de alpeorujó (DOR), extracto acuoso de alpeorujó (ADOR) y alpeorujó extractado con agua (SDOR). Las letras distintas en cada columna y números distintos en cada fila para cada tratamiento denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujó (%)	Residuo					
		DOR		ADOR		SDOR	
		Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
SE	0	139 f2	43 d1	140 cd2	44 a1	147 d2	48 c1
	2,5	31 bc2	7 ab1	106 bc3	41 a2	112 c3	59 d2
	5	12 ab1	6 ab1	83 abc3	33 a2	87 c3	40 c2
	10	3 a1	2 a1	69 ab4	16 a2	99 c5	33 bc3
SE+G.d	0	197 g2	97 f1	190 d2	100 b1	183 e2	93 e1
	2,5	91 e1	71 e1	224 e3	280 d3	278 g3	147 f2
	5	52 d1	45 d1	257 e3	262 d3	253 f3	190 g2
	10	32 bcd1	37 cd1	207 e3	186 c3	190 e3	144 f2 3
SNE	0	109 e2	24 bc1	101 bc2	22 a1	115 c2	29 b1
	2,5	36 cd2	10 ab1	64 ab3	30 a2	23 ab1 2	8 a1
	5	16 abc1	2 a1	68 ab3	21 a1	44 b2	3 a1
	10	4 a1	2 a1	28 a3	11 a2	14 a2	1 a1

El porcentaje de longitud de raíz colonizada por *G. deserticola* en tomate disminuyó en suelo no esterilizado y en suelo inoculado con *G. deserticola* en presencia de 5 y 10% de alpeorujó, mientras que en extracto acuoso de alpeorujó y alpeorujó extractado respecto al control sin alpeorujó, esta disminución solo se produjo a la dosis del 10% (Tabla 3). La aplicación de alpeorujó en concentraciones de 5 y 10% a plantas de alfalfa cultivadas en suelo esterilizado y suelo inoculado con *G. deserticola* disminuyó el porcentaje de longitud de raíz colonizada (Tabla 4). La aplicación de 10% de extracto acuoso de alpeorujó y de alpeorujó extractado disminuyó la colonización micorrícica de tomate tanto de *G. deserticola* como de los hongos micorrícicos autóctonos respecto al control sin residuos, mientras que solo disminuyó la colonización de alfalfa por los hongos micorrícicos autóctonos (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Porcentaje de longitud de raíz colonizada de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+Gd) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de alpeorujos (DOR), extracto acuoso de alpeorujos (ADOR) y alpeorujos extractados con agua (SDOR). Las letras distintas en cada columna y números distintos en cada fila para cada tratamiento denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujos (%)	Residuo		
		DOR	ADOR	SDOR
SE+G.d	0	45 c1	51 e1	50 c1
	2,5	42 c1	48 de1	54 c2
	5	27 b1	36 d12	40 bc2
	10	4 a1	28 cd2	38 b3
SNE	0	20 b1	18 bc1	21 b1
	2,5	16 b1	17 ab1	18 ab1
	5	4 a1	12 ab1 2	16 ab2
	10	2 a1	7 a2	3 a1

Tabla 4. Porcentaje de longitud de raíz colonizada de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivadas en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+Gd) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de alpeorujos (DOR), extracto acuoso de alpeorujos (ADOR) y alpeorujos extractados con agua (SDOR). Las letras distintas en cada columna y números distintos en cada fila para cada tratamiento denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujos (%)	Residuo		
		DOR	ADOR	SDOR
SE+G.d	0	62 d1	61 c1	64 b1
	2,5	59 d1	58 bc1	61 b1
	5	45 c1	57 bc2	58 b2
	10	17 b1	57 bc2	58 b2
SNE	0	54 cd1	58 bc1	51 b1
	2,5	53 cd1	53 b1	54 b1
	5	14 ab1	22 a1	22 a1
	10	3 a1	31 a2	13 a1 2

4.2. Efecto del extracto acuoso de alpeorujó, transformado por hongos saprobios, sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas

Materiales y métodos

En este ensayo se utilizó extracto acuoso de alpeorujó obtenido de forma orbital transformado con los hongos saprobios seleccionados tal y como se describe en la sección general de Materiales y Métodos. Dicho extracto se incubó durante 15 días con los hongos saprobios y tras su centrifugado y esterilización se añadió a las macetas en distintas proporciones.

Para el diseño del experimento se tuvieron en cuenta tres factores de variación. Estos factores fueron suelo esterilizado, suelo esterilizado inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* y suelo no esterilizado. Cada factor se diseñó teniendo en cuenta dos variables. La primera fue el factor incubación del extracto acuoso de alpeorujó con los hongos saprobios, que contenía 4 tratamientos: plantas con extracto acuoso de alpeorujó incubado sin hongo (Control) o con los hongos *P. chrysogenum*-10, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. La segunda variable consistió en la aplicación de diferentes dosis de extracto acuoso a las macetas: 0, 2,5, 5 y 10%. Este ensayo se realizó en plantas de tomate y alfalfa con cuatro repeticiones por tratamiento.

Los ensayos se realizaron siguiendo el sistema de cultivo y determinaciones descritas en el apartado 4.1.

Resultados

La aplicación de extracto acuoso de alpeorujó provocó una disminución en el peso seco de las plantas de tomate sobre todo a dosis superiores al 5% tal y como se observa en la Tabla 5. El extracto acuoso de alpeorujó inoculado con *P. chrysogenum*-10 redujo la toxicidad en las plantas de tomate cuando se aplicó a la dosis de 10% en suelo esterilizado, de 5 y 10% en suelo inoculado con *G. deserticola* y de 2,5 y 5% en suelo no esterilizado. Cabe destacar el efecto del extracto acuoso de alpeorujó inoculado con *P. chrysogenum*-10 en suelo inoculado con *G. deserticola* a una dosis de 5% ya que incrementó significativamente el crecimiento de las plantas de tomate respecto a los controles sin alpeorujó. La inoculación del extracto acuoso de alpeorujó con *T.*

versicolor eliminó la fitotoxicidad de dicho residuo e incrementó el crecimiento de las plantas a concentraciones del 2,5% en suelo esterilizado y suelo inoculado con *G. deserticola*. El tratamiento del extracto acuoso con *Py. cinnabarinus* solo redujo su fitotoxicidad frente a plantas de tomate a la dosis de 10% en suelos inoculados con *G. deserticola*, de 2,5% en suelo no esterilizado y a todas las dosis en suelos no esterilizados. *Py. cinnabarinus* no solo eliminó la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó sino que cuando se aplicó al suelo esterilizado a la dosis del 2,5 y 5% incrementó el peso seco de las plantas respecto a los controles sin alpeorujó (Tabla 5).

Tabla 5. Peso seco de la parte aérea (mg) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado (SE), suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+G.d) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de extracto acuoso de alpeorujó incubado sin hongo (Control) o con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujó (%)	SE	SE+ G.d	SNE
Control	0	232,7 de	281,0 de	106,2 de
	2,5	224,0 cde	320,2 de	112,2 e
	5	136,7 bc	216,2 cd	74,0 cd
	10	62,7 ab	105,0 ab	41,7 ab
<i>P. chrysogenum</i>-10	2,5	247,0 e	375,0 ef	196,0 g
	5	123,0 b	487,0 g	113,0 e
	10	151,0 cd	232,0 cd	52,0 ab
<i>T. versicolor</i>	2,5	334,0 fg	464,0 fg	41,7 ab
	5	149,0 cd	164,0 bc	23,7 ab
	10	21,0 a	23,0 a	14,0 a
<i>Py. cinnabarinus</i>	2,5	385,0 g	273,0 cde	150,0 f
	5	414,0 g	266,0 cde	82,0 cde
	10	296,0 ef	241,0 cd	70,0 bc

El efecto fitotóxico del extracto acuoso de alpeorujó sobre el crecimiento de plantas de alfalfa solamente se observó en suelo no esterilizado (Tabla 6). La inoculación del extracto acuoso de alpeorujó con *P. chrysogenum*-10 no solo eliminó la fitotoxicidad, sino que aumentó el peso de las plantas cuando se aplicó a suelo no esterilizado a cualquier dosis. El extracto acuoso de alpeorujó inoculado con *Py. cinnabarinus* tuvo un efecto similar al anterior ya que incrementó el peso de alfalfa cuando se aplicó al suelo esterilizado a la dosis de 2,5% y al suelo no esterilizado a todas las dosis utilizadas. *T. versicolor* no fue capaz de incrementar el peso de las plantas de alfalfa en ningún tratamiento (Tabla 6).

Tabla 6. Peso seco de la parte aérea (mg) de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivadas en suelo esterilizado (SE), suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+G.d) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de extracto acuoso de alpeorujó incubado sin hongo (Control) o con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujó (%)	SE	SE+ G.d	SNE
Control	0	71,2 bc	90,2 abc	51,7 cd
	2,5	54,0 abc	117,0 bc	39,0 bc
	5	42,0 abc	101,7 bc	33,0 b
	10	35,0 ab	94,5 abc	13,5 a
<i>P. chrysogenum</i>-10	2,5	81,0 cd	130,0 cd	78,0 ef
	5	54,0 abc	123,0 cd	135,0 g
	10	64,0 bc	81,0 ab	156,0 h
<i>T. versicolor</i>	2,5	71,0 bc	118,0 bc	46,0 bc
	5	39,0 abc	83,0 abc	36,5 bc
	10	31,0 ab	90,0 abc	11,0 a
<i>Py. cinnabarinus</i>	2,5	117,5 d	91,0 abc	66 de
	5	70,0 bc	97,0 bc	88,5 f
	10	13,7 a	56,0 a	47,5 bc

El porcentaje de longitud de raíz colonizada de plantas de tomate cultivadas en suelo no esterilizado disminuyó en presencia de cualquier dosis de extracto acuoso de alpeorujó mientras que en suelo inoculado con *G. deserticola* se necesitaron dosis de 5 o 10% de dicho extracto acuoso para disminuir los niveles de micorrización (Tabla 7). La incubación del extracto acuoso de alpeorujó con los hongos *P. chrysogenum-10*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* no modificó la disminución del porcentaje de longitud de raíz colonizada que se observó en ausencia de los hongos salvo en el caso de *P. chrysogenum-10* en suelo inoculado con *G. deserticola* a la dosis de 10% y *Py. cinnabarinus* en suelo no esterilizado a la dosis de 2,5% (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de longitud de raíz colonizada en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+G.d) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de extracto acuoso de alpeorujó incubado sin hongo (Control) o con los hongos saprobios *P. chrysogenum-10*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujó (%)	SE+ G.d	SNE
Control	0	51,2 d	22,5 gh
	2,5	37,7 bcd	17,0 def
	5	26,7 ab	12,0 bcd
	10	28,0 ab	6,7 ab
<i>P. chrysogenum-10</i>	2,5	45,0 cd	13,5 bcd
	5	31,0 abc	10,0 abc
	10	45,0 cd	4,0 a
<i>T. versicolor</i>	2,5	37,0 bcd	15,7 cde
	5	31,0 abc	11,0 abc
	10	22,0 a	5,5 ab
<i>Py. cinnabarinus</i>	2,5	52,0 d	24,5 g
	5	28,7 ab	18,0 def
	10	28,0 ab	7,7 ab

Capítulo IV

La aplicación de extracto acuoso en plantas de alfalfa cultivadas en suelo inoculado con *G. deserticola*, no disminuyó el porcentaje de longitud de raíz colonizada en cambio sí redujo dicho porcentaje cuando se aplicó en suelo no esterilizado (Tabla 8). Cabe destacar que tras la aplicación de extracto acuoso de alpeorujó incubado con *P. chrysogenum*-10 en suelos inoculados con *G. deserticola* a dosis de 2,5 y 5% superaron los niveles de micorrización de las plantas controles de alfalfa carentes de alpeorujó.

Tabla 8. Porcentaje de longitud de raíz colonizada en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivadas en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+G.d) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5, 5 y 10% de extracto acuoso de alpeorujó incubado sin hongo (Control) o con los hongos saprobios *P. chrysogenum*-10, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Concentración de alpeorujó (%)	SE+ G.d	SNE
Control	0	60,7 bcd	58,0 gh
	2,5	58,2 bcd	43,5 def
	5	51,2 ab	42,0 cde
	10	57,0 bcd	31,0 bc
<i>P. chrysogenum</i>-10	2,5	100,0 f	64,0 h
	5	87,0 e	57,0 gh
	10	70,0 cde	42,0 cde
<i>T. versicolor</i>	2,5	70,0 cde	56,0 gh
	5	60,0 bcd	28,0 ab
	10	39,0 a	19,0 a
<i>Py. cinnabarinus</i>	2,5	72,0 de	41,5 cde
	5	67,0 bcd	49,0 efg
	10	53,0 abc	34,0 bcd

4.3. Efecto del alpeorujó extractado con agua, transformado por hongos saprobios, sobre el desarrollo de plantas inoculadas con micorrizas

Materiales y métodos

En este ensayo se empleó alpeorujó extractado con agua incubado durante 60 días con los hongos saprobios seleccionados tal y como se describe en la sección general del capítulo Materiales y Métodos.

Se tuvieron en cuenta 3 factores de variación. Dichos factores fueron suelo esterilizado, suelo esterilizado inoculado con el hongo micorrícico *G. deserticola* y suelo no esterilizado. Cada factor contenía dos variables, una consistió en el factor inoculación del alpeorujó con los hongos saprobios que contenía 4 tratamientos: plantas con alpeorujó incubado sin hongo (Control) o con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. La segunda variable fue la proporción de alpeorujó añadido a las plantas 0, 2,5 y 5%. Se realizaron 3 repeticiones por cada tratamiento.

Los ensayos se realizaron siguiendo el sistema de cultivo y determinaciones descritas en el apartado 4.1.

Resultados

Tal y como se observa en la Tabla 9 el alpeorujó extractado con agua mostró marcados efectos fitotóxicos reduciendo un 60% el peso seco de las plantas de tomate cuando estas se cultivaron en suelo esterilizado. Los efectos fueron aún más drásticos en plantas cultivadas en suelo esterilizado e inoculado con *G. deserticola* o no esterilizado reduciéndose entre 80 y 90% el peso seco de las plantas. La fitotoxicidad del alpeorujó extractado se modificó por la incubación con los hongos saprobios aunque esta varió en función del hongo y del suelo utilizado. Todos los hongos redujeron la fitotoxicidad respecto a su control cuando el alpeorujó extractado se aplicó a dosis de 2,5% en todos los tipos de suelos ensayados. Cabe destacar el efecto de la inoculación del alpeorujó extractado con *Py. cinnabarinus* ya que a la concentración de 2,5% en suelo esterilizado llegó incluso a igualar el crecimiento de las plantas de tomate respecto a los controles sin alpeorujó. Solo el hongo *C. rigida* a la concentración de 5% disminuyó la

Capítulo IV

fitotoxicidad del alpeorujito extractado cuando se aplicó al suelo inoculado con *G. deserticola* y *Py. cinnabarinus* la redujo en suelo esterilizado y suelo no esterilizado (Tabla 9).

Tabla 9. Peso seco de parte aérea (mg) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado (SE), suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+G.d) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5 y 5% de alpeorujito extractado con agua incubado sin hongo (Control) o con hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamientos	Concentración de alpeorujito (%)	SE	SE+G.d	SNE
Control	0	403,3 d	790,2 f	255,1 e
	2,5	153,3 ab	96,6 a	50,2 ab
	5	100,0 a	140,5 abc	30,1 a
<i>C. rigida</i>	2,5	283,3 c	343,3 e	160,0 d
	5	180,0 abc	270,4 de	55,0 ab
<i>T. versicolor</i>	2,5	270,4 bc	240,1 cde	116,6 cd
	5	170,1 abc	106,6 ab	46,6 ab
<i>Py. cinnabarinus</i>	2,5	465,5 d	293,3 de	140,2 d
	5	270,1 bc	183,3 bcd	80,0 bc

El porcentaje de micorrización de plantas de tomate disminuyó con la aplicación del alpeorujito extractado con agua a las dosis de 5% en suelo inoculado con *G. deserticola* y a todas las dosis en suelo no esterilizado (Tabla 10). En el suelo inoculado con *G. deserticola* se observó un aumento en la micorrización cuando se aplicó alpeorujito extractado inoculado con *C. rigida* a la dosis de 2,5% y *T. versicolor* a la dosis de 2,5 y 5%. No se modificó el porcentaje de micorrización en plantas de tomate cultivadas en suelo no esterilizado tras la aplicación de alpeorujito extractado incubado con los hongos objeto de estudio salvo tras la incubación con *Py. cinnabarinus* en los que se observó una disminución de dicho porcentaje a la menor dosis.

Tabla 10. Porcentaje de longitud de raíz colonizada en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado inoculado con *G. deserticola* (SE+G.d) y suelo no esterilizado (SNE) en presencia de 0, 2,5 y 5% de alpeorujos extractados con agua incubado sin hongo (Control) o con los hongos saprobios *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus*. Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Tratamientos	Concentración de alpeorujos (%)	SE+G.d	SNE
Control	0	27,2 d	17,5 c
	2,5	24,5 d	11,0 b
	5	18,5 c	5,5 a
<i>C. rigida</i>	2,5	34,1 e	14,5 bc
	5	12,3 a	7,1 ab
<i>T. versicolor</i>	2,5	34,6 e	14,6 bc
	5	27,5 d	5,5 a
<i>Py. cinnabarinus</i>	2,5	13,2 b	4,7 a
	5	12,3 a	5,5 a

Discusión

Los bioensayos de germinación para valorar los efectos fitotóxicos de determinados compuestos, presentan muchas ventajas frente a otros tipos de bioensayos ya que durante el periodo de germinación hay un metabolismo rápido, transporte de nutrientes y una gran división celular, siendo en este caso las plantas muy susceptibles a los efectos fitotóxicos (Ugrekheldze *et al.*, 1999). Sin embargo, estas técnicas no tienen en cuenta sobre todo, el papel de los microorganismos del suelo donde se van a desarrollar las plantas. No obstante, se ha encontrado que determinados microorganismos rizosféricos pueden aumentar la fitotoxicidad del alpeorujos aplicado al suelo (Martín *et al.*, 2002).

El alpeorujos resultó altamente fitotóxico y dificultó el crecimiento de plantas de tomate y alfalfa. De hecho la mayoría de los autores han indicado que los efectos fitotóxicos de estos residuos son particularmente evidentes no solo durante la germinación sino en el desarrollo de las semillas de plantas superiores (Casa *et al.*,

2003). Ginos *et al.* (2006) indicó que la fitotoxicidad de los residuos del olivar disminuía considerablemente tras varios pre-tratamientos físicos, atribuyendo este hecho a la eliminación de sustancias fitotóxicas en la fase líquida. Las fracciones físicas realizadas en el alpeorujío es decir, el extracto acuoso de alpeorujío y el sólido resultante de la extracción con agua resultaron menos fitotóxicas que el alpeorujío de partida, sin embargo, este tratamiento físico no eliminó la toxicidad del alpeorujío. Se ha descrito que la fitotoxicidad de un compuesto puede afectar a las plantas de forma diferente en función de la especie o tipo de suelo (Caspersen *et al.*, 1999). En efecto, el extracto acuoso de alpeorujío, por ejemplo, fue más tóxico sobre plantas de alfalfa que de tomate. También se ha observado que las plantas de tomate y alfalfa mostraron un crecimiento menor en suelo no esterilizado y, en general, los mejores resultados, en cuanto a disminución de fitotoxicidad, se observaron siempre cuando se esterilizaba el sustrato. Este fenómeno quizás podría explicarse por la alteración que supone la esterilización del suelo de los componentes químicos del mismo o la eliminación de microorganismos de este que reaccionan incrementando la sensibilidad de las plantas a elementos fitotóxicos. De hecho, la inoculación microbiana de forma simultánea a la aplicación de alpeorujío puede facilitar la acción de transferencia de sustancias fitotóxicas del alpeorujío a las plantas, tal y como pudimos comprobar en nuestros ensayos en los que las plantas micorrizadas, tanto con *G. deserticola* como con micorrizas autóctonas, mostraron un crecimiento menor en presencia de alpeorujío (Martín *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha descrito que el suelo debido a la presencia de enzimas, microorganismos y componentes organominerales posee capacidad potencial para detoxificar pudiendo eliminar la carga fenólica del suelo (Proietti *et al.*, 1995; De Simone *et al.*, 1999). En nuestros ensayos la inoculación del hongo micorrízico *G. deserticola* no solo disminuyó la sensibilidad de las plantas a la fitotoxicidad del extracto acuoso y del alpeorujío extractado con agua, sino que aumentó considerablemente el crecimiento de alfalfa y tomate en presencia de bajas dosis de estas fracciones. El aumento de las condiciones nutricionales de la planta y la protección ante situaciones de estrés por la acción beneficiosa de los hongos micorrízicos ha sido citado por diversos autores (Weissenhorn *et al.*, 1995; George *et al.*, 1995) a lo que podría deberse el hecho de que los extractos de alpeorujío afecten en menor grado a las plantas micorrizadas. Según Donnelly y Fletcher (1994) los hongos micorrízicos son muy importantes como agentes biorremediadores, pero hoy en día se desconoce el comportamiento de las micorrizas arbusculares en la sensibilidad de las plantas frente a diferentes fracciones de alpeorujío. Se piensa que al igual que ocurre con

los metales pesados o pesticidas en el suelo, las sustancias fitotóxicas presentes en el alpeorujó pueden influir en el incremento de la sensibilidad y/o resistencia que le pueden proporcionar los hongos arbusculares a las plantas (Ocampo, 1993; Khan *et al.*, 2000). Por otro lado, la efectividad en esta modificación de la sensibilidad a la fitotoxicidad del alpeorujó por el hongo micorrícico depende además del tipo de asociación hongo arbuscular-planta (Martín *et al.*, 2002; Isidori *et al.*, 2005; Komolis *et al.*, 2005). De hecho los hongos autóctonos no contribuyeron a paliar los efectos fitotóxicos de las fracciones físicas del alpeorujó sobre plantas de alfalfa y solo lo hicieron en plantas de tomate cuando este se aplicó a bajas dosis.

El establecimiento de la simbiosis parece depender en gran medida de la concentración de compuestos tóxicos en el suelo (Fries *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2005). Como se ha observado previamente, el porcentaje de longitud de raíz colonizada por *G. deserticola* y por los hongos autóctonos disminuyó considerablemente en presencia de alpeorujó. El efecto de las fracciones físicas del alpeorujó en la colonización micorrícica parece actuar a nivel de la planta al igual que ocurre con el alpeorujó (Martín *et al.*, 2002). De hecho, la disminución del porcentaje de raíz colonizada en tomate por extracto acuoso de alpeorujó y por el alpeorujó extractado con agua fue paralelo a la disminución del peso seco de la planta, en cambio no disminuyó ni el porcentaje de micorrización ni el peso seco de alfalfa inoculada con *G. deserticola*. Como sucede con otros contaminantes del suelo, el efecto del extracto acuoso de alpeorujó y del alpeorujó extractado con agua en la colonización micorrícica depende del tipo de hongo (Volante *et al.*, 2005) de hecho, las fracciones físicas del alpeorujó disminuyeron el porcentaje de micorrización en alfalfa por hongos autóctonos pero no por *G. deserticola*.

Los hongos saprobios disminuyeron la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó sobre las plantas ensayadas, a excepción de *T. versicolor* que no tuvo efecto alguno sobre plantas de alfalfa. Como se ha mencionado anteriormente, el tipo de planta es un factor determinante de la resistencia frente a la toxicidad de los residuos procedentes de la aceituna y también de la repercusión que van a tener los hongos saprobios sobre la disminución de la toxicidad de estos residuos (Capasso *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 2004). El extracto acuoso de alpeorujó incubado con los hongos *P. chrysogenum*-10 y *Py. cinnabarinus* se comportó como un fertilizante cuando se aplicó a dosis bajas sobre todo en plantas de tomate cultivadas en suelos esterilizados ya que incrementaron el peso seco de las plantas respecto a las cultivadas en ausencia de

alpeorujos. Este efecto potenciador del crecimiento puede deberse a que *Py. cinnabarinus* degrada una gran cantidad de fenoles mediante la producción de lacasa cuando se cultiva en extractos acuosos de alpeorujos. *P. chrysogenum*-10, por otro lado, aunque no degrada fenoles sí muestra intensas actividades hidrolíticas en estos extractos con enzimas que podrían degradar sustancias de naturaleza no fenólica pero fitotóxicas y que, por tanto, podrían resultar beneficiosas en el desarrollo de las plantas.

El efecto fertilizante de dosis bajas (2,5%) de extracto acuoso de alpeorujos inoculado con los hongos saprobios se produjo tras la inoculación de las plantas con el hongo arbuscular *G. deserticola*. El efecto beneficioso del hongo arbuscular más destacable fue en el caso del extracto acuoso tratado con *T. versicolor* ya que mostró un efecto fertilizante en plantas de tomate solo cuando se inoculó con *G. deserticola*. En este caso, de nuevo cobra importancia el tipo de planta ya que ambos hongos no disminuyeron la toxicidad causada por el extracto acuoso de alpeorujos en plantas de alfalfa. Las micorrizas autóctonas también favorecieron la tolerancia de las plantas frente a la presencia del extracto acuoso de alpeorujos sobre todo frente aquellos extractos tratados con hongos saprobios. Sin embargo, este efecto favorecedor del descenso de fitotoxicidad en presencia de los hongos arbusculares no se debió a un aumento en la colonización micorrícica ya que en ninguno de los casos la aplicación de extracto acuoso aumentó el porcentaje de raíz colonizada. No obstante, se ha observado que no siempre hay relación entre el porcentaje de micorrización y la efectividad de la simbiosis (Vierheilig y Ocampo, 1991; García-Garrido *et al.*, 2000). Por otro lado, los hongos saprobios son capaces, no solo de eliminar elementos fitotóxicos presentes en el alpeorujos, sino que también pueden producir metabolitos que favorezcan la acción beneficiosa de las micorrizas arbusculares (García-Romera *et al.*, 1998; Fracchia, 2002).

Los hongos saprobios no paliaron el efecto inhibitorio del extracto acuoso de alpeorujos sobre el porcentaje de micorrización de las plantas ensayadas. Se sabe que los hongos saprobios en su proceso de incubación del alpeorujos y sus fracciones son capaces de disminuir la cantidad de fenoles de estos residuos (Sampedro *et al.*, 2004b) por tanto podemos pensar que los fenoles no serían los causantes del descenso en la colonización. Cabe pensar que algún tipo de sustancia presente en dicho extracto podría estar inhibiendo la colonización a nivel de la germinación de las esporas tal y como se ha observado con sustancias de tipo flavonoide, insecticidas o metales pesados (Scervino *et al.*, 2005a, b; Menéndez *et al.*, 1999; Pawlowska y Charvat, 2004). En algunos estudios donde se aplicaban lodos de plantas residuales a plantas micorrizadas

se ha comprobado que es imposible separar los efectos de los metales pesados, materia orgánica y estatus nutricional que aportan los residuos, en la infección micorrícica (Angle y Heckman, 1986) todo lo cual nos hace difícil discernir el efecto del extracto acuoso de alpeorujos en la infección micorrícica.

Como se ha mencionado anteriormente la extracción con agua de los componentes solubles del alpeorujos no eliminó la fitotoxicidad del residuo, pero sí contribuyó a la reducción de dicha fitotoxicidad. El alpeorujos extractado resultó menos fitotóxico que el alpeorujos sin tratar, pero más que su respectivo extracto acuoso, de manera que los efectos fitotóxicos que no produjo el extracto acuoso los produjo el sólido extractado con agua. En ese ensayo se vuelve a comprobar como el empleo de un suelo no esterilizado en los ensayos con plantas potencia los efectos negativos de los residuos debido, posiblemente, a los microorganismos del suelo que facilitan la transferencia de sustancias fitotóxicas o a la presencia de materia orgánica polimerizada inaccesible para la planta. Todos los hongos ligninolíticos redujeron la fitotoxicidad del alpeorujos extractado respecto a su control a las dosis del 2,5%, sin llegar en ningún caso a igualar a las plantas cultivadas sin residuo de alpeorujos, hecho que si tuvo lugar tras la incubación del residuo con *Py. cinnabarinus* en suelo esterilizado. En este caso las micorrizas no favorecieron el crecimiento de las plantas en presencia del residuo, probablemente debido a la mayor concentración de sustancias tóxicas en el alpeorujos extractado que en el extracto acuoso, salvo en el caso del alpeorujos extractado tratado con *C. rigida*. Diversos autores han observado que en presencia de sustancias tóxicas las micorrizas pueden actuar favoreciendo el transporte de sustancias tóxicas al interior de las plantas dado el aumento de superficie que provocan en la raíz y por tanto potenciando los efectos negativos de los contaminantes (Leyval *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 2002).

Según estudios realizados por Vassilev *et al.* (1998) con el empleo de alpechín como fertilizante, la micorrización por *G. deserticola* no se afectó por la presencia del residuo tratado o sin tratar, en cambio en nuestros ensayos el porcentaje de micorrización disminuyó por la presencia del alpeorujos o sus fracciones a partir de dosis del 5% de residuo tal y como observaron otros autores (Martín *et al.*, 2002), salvo en el caso del alpeorujos extractado con agua e inoculado con *C. rigida* y *T. versicolor* que aplicado a bajas dosis provocó un aumento en el porcentaje de micorrización. Las micorrizas autóctonas del suelo también disminuyeron su colonización por la presencia del residuo. Algunos estudios han mostrado como fenoles del tipo flavonoide pueden

Capítulo IV

actuar aumentando o disminuyendo la germinación de esporas en función de la concentración (Fries *et al.*, 1997) además están implicados en procesos de regulación de la simbiosis siendo un proceso altamente complejo que no solo depende del tipo de flavonoide sino también de la especie de hongo (Scervino *et al.*, 2005b). El alpeorajo presenta flavonoides, sustancias que se extraen principalmente con solventes como el n-propanol como se ha visto anteriormente en el capítulo III que podrían afectar a las micorrizas disminuyendo el grado de colonización.

Capítulo V



*Efecto del uso del alpeorujó y sus fracciones
físicas sobre el desarrollo de plantas en
ensayos de invernadero y campo*

V. Efecto del alpeorujó y sus fracciones físicas tratadas con hongos saprobios sobre el desarrollo de plantas bajo condiciones de campo

Objetivo

Uno de los fines del tratamiento integrado del alpeorujó mediante un pre-tratamiento físico y posteriormente uno biológico es su uso como fertilizante en agricultura. Mediante estos ensayos se pretende ver los efectos de ambos tratamientos en el alpeorujó, sobre el crecimiento de plantas cultivadas en condiciones de invernadero y campo.

5.1. Efecto del alpeorujó extractado con acetato de etilo y transformado por *C. rigida* en ensayos de invernadero

Materiales y métodos

Diseño experimental

En este ensayo se utilizó alpeorujó sin tratar y alpeorujó extractado mediante soxhlet con acetato de etilo (ensayo 1) y con agua (ensayo 2), ambos incubados sin hongo o con *C. rigida*. Este alpeorujó se añadió a plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a distintas concentraciones.

Ensayo 1

En este ensayo se tuvieron en cuenta 2 factores de variación que fueron suelo esterilizado (A) y no esterilizado (B). Cada factor contenía 3 variables: una consistió en el factor inoculación del alpeorujó con un hongo saprobio que contenía 5 tratamientos: plantas sin alpeorujó (Control), con alpeorujó incubado sin hongo (DOR) o con el hongo saprobio *C. rigida*, con alpeorujó extractado con acetato de etilo incubado sin hongo (EtOAc) o con el hongo *C. rigida*. La segunda variable fue la proporción de alpeorujó añadido a las macetas 2,5 y 5%. La tercera variable consistió en el tiempo de incubación del alpeorujó con el hongo saprobio (15 y 30 días). Se realizaron 3 repeticiones por cada tratamiento.

Ensayo 2

Se realizó de igual forma pero usando alpeorujos extractados con agua en Soxhlet (Agua III) e incubados durante 15 y 30 días con *C. rigida* (Agua III-C.ri).

Sistema de cultivo

Se utilizaron macetas de 300 ml de capacidad que contenían una mezcla de suelo: arena (1:1) esterilizado o no esterilizado según el ensayo. El alpeorujos o alpeorujos extractados, incubados con o sin hongo saprobitario durante 15 y 30 días se esterilizaron y se añadieron a las macetas en proporciones de 2,5 y 5%. Las semillas de tomate se esterilizaron en superficie y tras su germinación se seleccionaron en base a la homogeneidad de tamaño disponiendo una plántula por maceta. Las plantas se cultivaron bajo condiciones controladas de invernadero y semanalmente se aplicó 10 ml de solución nutritiva Hewitt.

Las macetas se cosecharon a las 5 semanas de crecimiento y tras separar la parte aérea de la raíz se determinó el peso seco de la parte aérea después de su secado en estufa durante 48 h a 70 °C.

Resultados

Tal y como se observa en la Fig. 1 las plantas de tomate crecieron mejor en suelos esterilizados que en suelos no esterilizados. Cuando se aplicó alpeorujos sin tratar o extractados con acetato de etilo en suelos esterilizados se observó una disminución del peso de las plantas de tomate de un 90 y 55% respectivamente mientras que en suelos no esterilizados la disminución fue del 95 y 70%.

La inoculación del alpeorujos sin tratar con *C. rigida* no modificó significativamente la toxicidad de este, tanto en suelos esterilizados como no esterilizados, en cambio el tratamiento del alpeorujos extractado con acetato de etilo incubado durante 15 días y 30 días con el hongo *C. rigida* eliminó la fitotoxicidad del residuo alcanzando valores similares a los de las plantas control cuando se aplicó a dosis del 2,5%. Cuando se aplicaron dosis de alpeorujos del 5% no se observaron modificaciones en la fitotoxicidad (Fig. 1).

El alpeorujos extractado con agua disminuyó el peso de las plantas de tomate cultivadas tanto en suelo esterilizado como en suelo no esterilizado. *C. rigida* eliminó la fitotoxicidad del alpeorujos extractado con agua en plantas cultivadas en suelo

esterilizado pero no disminuyó la fitotoxicidad del extracto en plantas cultivadas en suelo no esterilizado (Fig. 2).

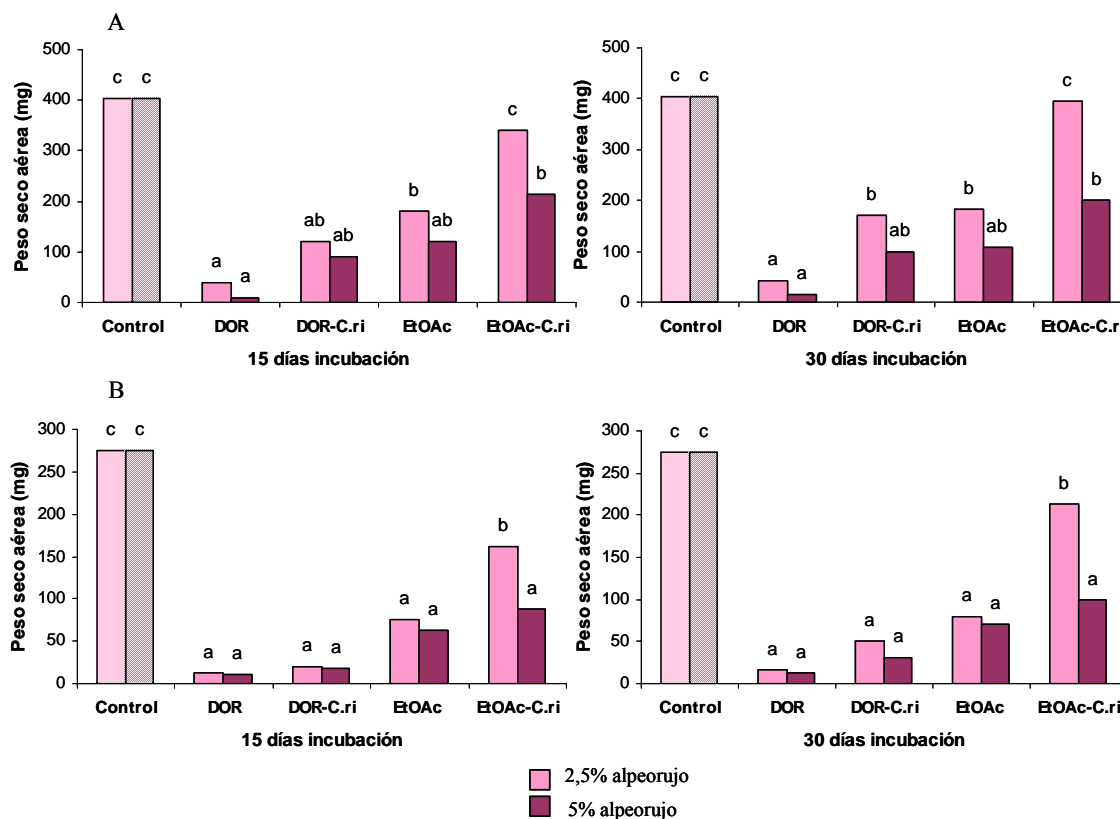


Fig. 1. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado (A) y no esterilizado (B) sin alpeorujos (Control) y con varias concentraciones de alpeorujos (2,5 y 5%) incubado sin hongo (DOR) o con el hongo *C. rigida* (DOR-C.ri) y alpeorujos extractados con acetato de etilo en Soxhlet incubado sin hongo (EtOAc) o con el hongo *C. rigida* (EtOAc-C.ri) durante 15 y 30 días. Letras distintas para cada tiempo de incubación y tratamiento indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

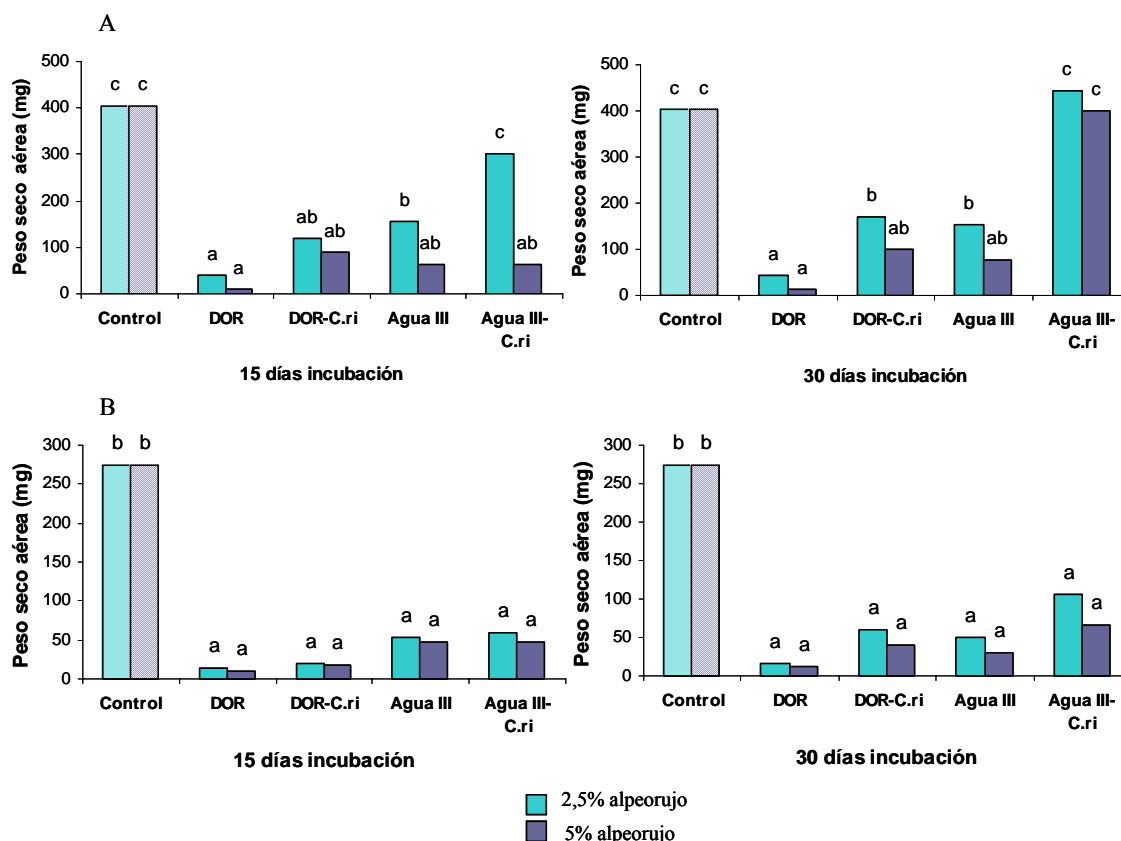


Fig. 2. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas en suelo esterilizado (A) y no esterilizado (B) sin alpeorujos (Control) y con varias concentraciones de alpeorujos (2,5 y 5%) incubado sin hongo (DOR) o con el hongo *C. rigida* (DOR-C.ri) y alpeorujos extractados con agua en soxhlet incubado sin hongo (Agua III) o con el hongo *C. rigida* (Agua III-C.ri) durante 15 y 30 días. Letras distintas para cada tiempo de incubación y tratamiento indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

5.2. Efecto del alpeorujos extractado con acetato de etilo y transformado por *C. rigida* en ensayos de campo

Materiales y métodos

Diseño experimental

El experimento se diseñó teniendo en cuenta tres factores de variación que fueron el tiempo de cultivo de las plantas de tomate: 2, 6 y 10 semanas. Cada factor contenía 5 tratamientos: plantas sin alpeorujos (Control), con alpeorujos incubado sin hongo (DOR) o con el hongo saprobitario *C. rigida* durante 20 semanas, con alpeorujos extractados en

soxhlet con acetato de etilo incubado sin hongo (EtOAc) o inoculado con el hongo *C. rigida* durante 4 semanas. Este ensayo se realizó en plantas de tomate con seis repeticiones por tratamiento.

Sistema de cultivo

Se utilizaron semillas de tomate esterilizadas en superficie y pregerminadas en semillero, las cuales se transfirieron a macetas de 100 ml de capacidad que contenían una mezcla de arena:suelo:vermiculita (1:1:1). Al mes de crecimiento en condiciones de invernadero se sembraron en parcelas de 40x30 cm de la EEZ a las que previamente se había mezclado el suelo hasta alcanzar la concentración del 5% (v:v) del alpeorujos sin tratar o extractado con acetato de etilo e incubados o no con *C. rigida*. En cada una de las parcelas se aplicó un tratamiento realizando 3 repeticiones por tratamiento y se sembraron 4 plantas de tomate. Las plantas se regaron en función de sus necesidades hídricas.

A las plantas de tomate cosechadas a las 2 y 6 semanas de crecimiento se les determinó el peso seco de la parte aérea después de secarla en estufa durante 48 h a 70 °C. A las plantas de 10 semanas se les recolectó los frutos de tomate determinando el peso fresco de los mismos.

Resultados

Los resultados del ensayo en campo mostraron que tanto el alpeorujos sin tratar como el alpeorujos extractado con acetato de etilo resultaron fitotóxicos para las plantas de tomate de 2 semanas (Fig. 3). Este efecto fitotóxico se incrementó al aumentar el tiempo de cultivo de las plantas de tomate. Tras el tratamiento con *C. rigida* se observó en general un descenso en la fitotoxicidad de dichos alpeorujos aunque en ningún caso el peso de las plantas de tomate llegó a superar a las plantas control. A las 2 semanas de cultivo la disminución de la fitotoxicidad se detectó solamente en el caso del alpeorujos extractado con acetato de etilo e incubado con *C. rigida*, sin embargo a las 6 semanas *C. rigida* fue capaz de reducir la fitotoxicidad tanto del alpeorujos sin tratar como del alpeorujos extractado (Fig. 3).

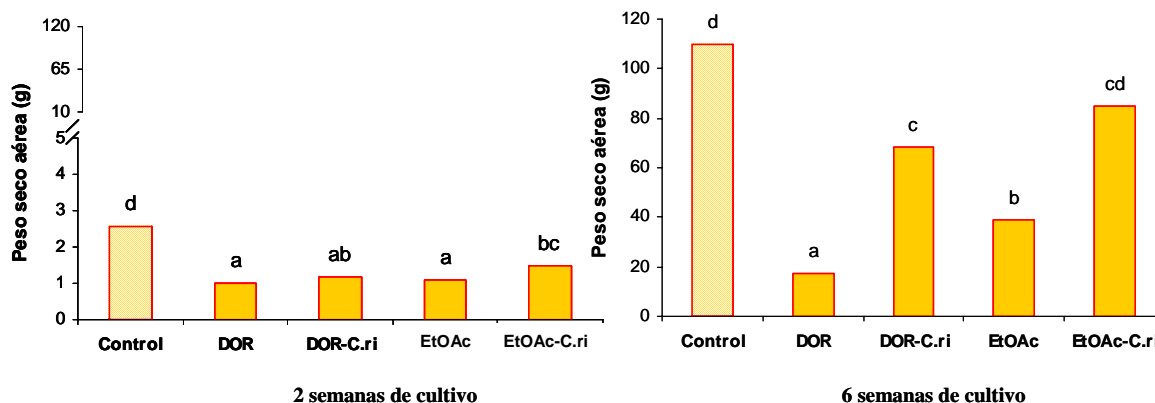


Fig. 3. Peso seco de la parte aérea (mg) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas durante 2 y 6 semanas sin alpeorujío (Control) y en presencia de alpeorujío incubado durante 20 semanas sin hongo (DOR) o con el hongo *C. rigida* (DOR-C.ri) y alpeorujío extractado con acetato de etilo incubado durante 4 semanas sin hongo (EtOAc) o incubado con el hongo *C. rigida* (EtOAc-C.ri). Las letras distintas en cada columna para cada tiempo de cultivo denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Nuestros resultados muestran como la cosecha de tomates descendió drásticamente y de forma similar con la aplicación tanto de alpeorujío sin tratar como de alpeorujío extractado con acetato de etilo (Fig. 4). La inoculación del alpeorujío sin tratar y alpeorujío extractado con acetato de etilo con *C. rigida* incrementó de igual forma la cosecha de tomates respecto a los controles no inoculados con el hongo llegando a igualar a la cosecha de tomate sin alpeorujío.

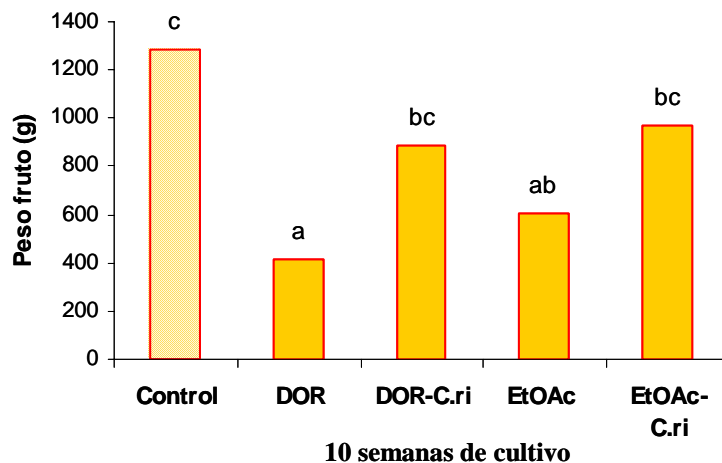


Fig. 4. Peso de frutos (g) de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cultivadas durante 10 semanas sin alpeorujos (Control) o en presencia de alpeorujos incubados durante 20 semanas sin hongo (DOR) o con el hongo *C. rigida* (DOR-C.ri) y alpeorujos extractados con acetato de etilo incubado durante 4 semanas sin hongo (EtOAc) o incubado con el hongo *C. rigida* (EtOAc-C.ri). Las letras distintas en cada columna denotan diferencias significativas según el test de Duncan ($p \leq 0,05$).

Discusión

Algunos estudios han mostrado que la biorremediación del alpechín se favorece con varios pretratamientos físicos ya que permite con ello un mejor tratamiento biológico (Beccari *et al.*, 1999; Komilis *et al.*, 2005). La extracción de la fracción fenólica del alpeorujos con acetato de etilo, que eliminó un 10% del contenido fenólico, provocó una disminución de la fitotoxicidad del alpeorujos en plantas de tomate en ensayos de invernadero. Este hecho sugiere que los fenoles extraídos, que fueron principalmente hidroxitirosol, p-tirosol, ácido protocatecuico, ácido dihidroximandélico, ácido vainílico, ácido p-cumárico, monoacetil hidroxitirosol, ácido elenólico, oleuropeina, ligustrósido y luteolina, contribuyen en gran medida a la fitotoxicidad del alpeorujos. Este resultado se contradice con aquellos mostrados por algunos autores que comprobaron que tras la extracción de los fenoles del alpechín el residuo seguía siendo fitotóxico (Capasso *et al.*, 1992). A pesar de extraer mayor cantidad de fenoles con el agua que con el acetato de etilo se observaron resultados similares en cuanto a fitotoxicidad en plantas de tomate, lo que indica que el extracto acuoso también

contiene parte de las sustancias que se extraen con acetato de etilo y que contribuyen de una forma similar a la fitotoxicidad del alpeorujo.

El tratamiento biológico de las fracciones físicas del alpeorujo con el hongo saprobio *C. rigida* contribuyó a disminuir e incluso a eliminar su fitotoxicidad. En todos los estudios realizados sobre la utilización de residuos procedentes de la aceituna coinciden en la necesidad de un tratamiento biológico antes de su aplicación, ya que de lo contrario, habría que diluir el residuo para no conseguir efectos negativos. Así Cereti *et al.* (2004) comprobó efectos positivos en el crecimiento del trigo aplicando alpechín tratado con *A. níger* y suplementado con fosfato de roca. También se han realizado estudios de aplicación de alpechín tratado con hongos para el crecimiento de trébol, plantas ornamentales y plantas con interés agrícola como garbanzo, tomate, trigo o habichuela (Vassilev *et al.*, 1998; García-Gómez *et al.*, 2002; Mekki *et al.*, 2006a).

Los elementos fitotóxicos del alpeorujo, principalmente fenoles, son muy recalcitrantes y es necesario al menos un periodo de 20 semanas de incubación con hongos saprobios para reducirlos o eliminarlos (Sampedro, 2005). Sin embargo el tratamiento físico del alpeorujo con acetato de etilo o con agua permitió que el hongo saprobio *C. rigida* disminuyera e incluso eliminara la fitotoxicidad del residuo en un periodo de 15-30 días. La combinación de ambos tratamientos, físico y biológico, permitiría, por un lado, la utilización de sustancias de interés industrial presentes en el extracto de acetato de etilo y agua como es el hidroxitirosol (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002; Fernández-Bolaños *et al.*, 2004), y por otro, acortar el tiempo de detoxificación del residuo sólido mediante la utilización de hongos saprobios.

Los residuos del olivar, cuando se emplean como enmendantes en condiciones de campo, tienen un efecto negativo en las propiedades del suelo ya que produce: inmovilizaciones del N disponible dada su baja relación C/N, aumento en la salinidad por su bajo pH e impermeabilización como consecuencia de la disminución de su porosidad, pero a pesar de ello aumentan el contenido en nutrientes y población bacteriana y fúngica del suelo y por tanto genera un efecto beneficioso en la fertilidad del mismo (Gallardo-Lara y Pérez, 1990; Saviozzi *et al.*, 1991; Cabrera *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1997; Albuquerque *et al.*, 2004; Mekki *et al.*, 2006b). Se sabe además que el contenido en materia orgánica y el pH del suelo son factores muy importantes que influyen en la fitotoxicidad de los fenoles (Wang *et al.*, 1967) con lo cual no solamente hay que tener en cuenta la fitotoxicidad del alpeorujo como un hecho aislado sino como un conjunto de factores que interactúan entre ellos produciendo una determinada

toxicidad en las plantas. El alpeorujó y sus fracciones físicas provocan un efecto más drástico en la disminución del peso seco de las plantas cuando se aplica al suelo no esterilizado de forma que ninguno de los tratamientos utilizados en el suelo no esterilizado consiguió eliminar completamente la fitotoxicidad del alpeorujó. La síntesis de sustancias tóxicas en la transformación de los residuos por los microorganismos autóctonos puede explicar este hecho. En efecto, los microorganismos autóctonos existentes en el suelo de nuestros ensayos no permitieron la acción detoxificadora de *C. rigida* sobre el alpeorujó extractado con agua, aunque si disminuyó la fitotoxicidad causada por el alpeorujó extractado con acetato de etilo.

Se han realizado numerosos estudios sobre residuos de olivar, sobre todo de alpechines, aplicados como enmendantes o fertilizantes a diferentes tipos de plantas encontrando múltiples efectos en función de la cantidad de residuo aplicada (Tomati y Galli, 1992; Ammar y Ben Rouina, 1999; Rinaldi *et al.*, 2003; El Hadrami *et al.*, 2004). Nuestros resultados mostraron que, en el ensayo de campo, el efecto fitotóxico del alpeorujó sobre las plantas de tomate fue menos drástico que en invernadero a pesar de utilizar la misma dosis de residuo (20g/kg suelo). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el suelo de campo interviene más el factor dilución del alpeorujó que en el de las macetas. No obstante, se observa un paralelismo de los resultados obtenidos en los ensayos de campo con los de invernadero, ya que la aplicación de alpeorujó redujo el crecimiento de las plantas de tomate y el tratamiento físico de extracción con acetato de etilo no eliminó la fitotoxicidad del residuo en ambos experimentos. Sin embargo, *C. rigida* fue capaz de eliminar la fitotoxicidad del alpeorujó extractado con acetato de etilo de forma que tanto el peso seco de la parte aérea como la producción de frutos fue similar al de plantas cultivadas en ausencia de alpeorujó. Hay que destacar que *C. rigida* fue capaz de eliminar la fitotoxicidad del alpeorujó extractado con acetato de etilo después de 30 días de incubación mientras que el hongo saprobio necesitó 20 semanas para producir el mismo efecto en el alpeorujó sin tratar. Este resultado supone una mayor eficacia en la detoxificación del alpeorujó e incrementa la posibilidad de utilizar este residuo como fertilizante.

Discusión general



DISCUSIÓN GENERAL

El alpeorujo es un subproducto que resulta fitotóxico para las plantas ya que la aplicación de una dosis agronómica del 5% a plantas de tomate produce una reducción del 90% del peso seco de la parte aérea. La fitotoxicidad de este residuo es debida a la presencia de sustancias de distinta naturaleza las cuales interactúan en el seno de una matriz compleja confiriéndole dichas propiedades. Los ácidos fenólicos y otras sustancias contenidas en la fracción soluble del alpeorujo parecen ser los principales responsables de la fitotoxicidad. Sin embargo, el residuo sólido resultante de la extracción acuosa, también es tóxico para la plantas lo que indica que no solo son las sustancias solubles en agua las responsables de la fitotoxicidad del alpeorujo.

Nuestros resultados mostraron que tras realizar un fraccionamiento del alpeorujo de forma orbital con agua, acetato de etilo, acetato de etilo y agua y metanol, el extracto acuoso de alpeorujo fue el más fitotóxico, inhibiendo la germinación de semillas de berro, con lo que la fracción soluble de alpeorujo podría ser la mayor responsable de los efectos fitotóxicos del alpeorujo. Este hecho puede deberse a la presencia de una alta concentración fenólica, una alta concentración de polisacáridos junto con fracciones poliméricas solubles responsables del color, ya que fue el extracto que contuvo más sustancias de este tipo. El extracto de acetato de etilo mostró fenoles de tipo o-difenoles predominando el hidroxitirosol y el p-tirosol como fenoles mayoritarios. Algunos de estos fenoles y en particular el hidroxitirosol son conocidos por sus propiedades antioxidantes y se ha relacionado con la fitotoxicidad del alpeorujo, con lo que el extracto de acetato de etilo, además de constituir una vía para la disminución de la fitotoxicidad, puede ser visto como una fuente de obtención de antioxidantes. A pesar de la tipología de sustancias que contiene el extracto de acetato de etilo, este no resultó tan fitotóxico, hecho atribuible a la insolubilidad de dicho extracto en agua o bien a los niveles de concentración aplicados que fueron mucho menores, en cuanto a contenido fenólico se refiere, respecto al extracto acuoso. En cambio su respectivo sólido extractado sí continuó siendo fitotóxico, posiblemente debido a restos del solvente o una ineficacia en el proceso extractivo orbital. El extracto metanólico mostró una fitotoxicidad menor que el extracto acuoso y mayor que el extracto de acetato de etilo en estrecha relación con su contenido fenólico, mientras que el sólido extractado con

metanol permaneció siendo fitotóxico posiblemente debido a la naturaleza de los componentes extraídos.

El fraccionamiento físico del alpeorujó en el soxhlet resultó más efectivo que el orbital, de manera que la extracción en soxhlet aumentó el contenido de fenoles extraídos con el acetato de etilo en más del triple que con extracción orbital, aumentando con ello la fitotoxicidad del extracto, pudiéndose relacionar la cantidad de fenoles con la fitotoxicidad. Esta relación entre la fitotoxicidad y la presencia de fenoles permite afirmar que los fenoles intervienen en la fitotoxicidad dependiendo de la concentración. A su vez quedó un sólido extractado con acetato de etilo con una fitotoxicidad menor a la del alpeorujó sin tratar. El extracto acuoso volvió a resultar la fracción más fitotóxica junto con el extracto de acetato de etilo, confirmándose la implicación de los ácidos fenólicos en la fitotoxicidad. El residuo sólido de alpeorujó que queda después de haber sido extractado con agua también mostró una toxicidad menor que el alpeorujó sin tratar. El papel de la fracción fenólica, extraída con acetato de etilo, en la fitotoxicidad se pone de manifiesto tras la reducción de la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujó al que previamente se había extraído con acetato de etilo.

La extracción secuencial del alpeorujó permitió la extracción de todos los componentes fenólicos hasta dejar un residuo prácticamente sin fenoles el cual careció de fitotoxicidad. Se detectaron 25 compuestos de naturaleza fenólica de los cuales 3 no se pudieron identificar. Observando todos los fenoles se puede decir que el alpeorujó está constituido por un gran abanico de fenoles de una amplia naturaleza siendo éstos el ácido protocatecuico, hidroxitirosol, hidroxitirosol glucósido, p-tirosol, ácido dihidroximandélico, ácido vainílico, ácido tetrahidroximandélico, oleósido, ácido p-cumarico, oleuropeina aglicona, ácido 3,4,5 trimetoxibenzoico, hidroxitirosol acetato, ácido elenólico, luteolina-glucósido, luteolina-rutinosido forma dialdehídica de la dicarboximetil oleuropeina aglicona oxidada; verbascósido, oleuropeina, 6'- β -glucopiranosil-oleósido, 6'- β -ramnopiranosil-oleósido, ligustrósido, luteolina y polimerina. De todos estos compuestos, el 6'- β -glucopiranosil-oleósido y el 6'- β -ramnopiranosil-oleósido se detectaron por primera vez en alpeorujó. Algunos de ellos aparecieron en todos los solventes hasta su total extracción mientras que otros fueron más específicos de cada solvente. En general el acetato de etilo extrajo los fenoles

monoméricos y ácidos fenólicos, el propanol extrajo fenoles de tipo flavonoide y secoiridioide, el metanol extrajo principalmente oleósidos y flavonoides y finalmente el agua que se caracterizó por la presencia, además de flavonoides, de un conjunto de compuestos poliméricos que aparecieron coeluidos, descritos en la literatura como la polimerina. La extracción secuencial permitió una reducción gradual de la fitotoxicidad del residuo del alpeorujó resultante después de cada procedimiento.

Los hongos saprobios más efectivos en la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó fueron los hongos ligninolíticos, si bien en todos los casos no se pudo relacionar esta disminución exclusivamente con la reducción del contenido fenólico. La maquinaria enzimática de estos hongos permite la modificación de la fracción fenólica del alpeorujó, tanto en cultivos líquidos como en cultivos sólidos y cuyas enzimas están implicadas en procesos de degradación de una amplia variedad de residuos. A pesar de que algunos hongos saprobios del suelo también son efectivos en la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó, así como de diversos componentes tóxicos, estos muestran una degradación más selectiva que los hongos ligninolíticos en función del tipo de medio, degradando principalmente polisacáridos, además de la posibilidad de liberación de metabolitos secundarios fitotóxicos. Sin embargo, los hongos ligninolíticos, no produjeron metabolitos secundarios en el alpeorujó que fueran tóxicos para las plantas o para la microflora del suelo. El alpeorujó o extractos del mismo no inhibieron el crecimiento de los hongos, tanto ligninolíticos como saprobios del suelo, siendo capaces de crecer incluso a altas concentraciones de alpeorujó sin requerir inductores, fuentes carbonadas o nitrogenadas para la degradación de diversas sustancias.

Las enzimas fúngicas tanto hidrolíticas como ligninolíticas mostraron tener un papel muy importante en el mecanismo de detoxificación del alpeorujó de modo que, en la mayoría de los casos, se observó una relación entre el descenso del contenido fenólico la producción de enzimas lacasa, Mn peroxidasa o ambas y el descenso de la fitotoxicidad. La polimerización y despolimerización de estos fenoles parece ser, según estudios previos, uno de los mecanismos de actuación de estas enzimas llegando en ocasiones a formar moléculas de un tamaño tal que impediría su acceso a través de cubiertas y paredes celulares, pero por otro lado podrían despolimerizar estas moléculas formando polímeros con un tamaño lo suficientemente pequeño como para penetrar en las células vegetales, este hecho explicaría casos en los que se observa una disminución

del contenido fenólico y en cambio se mantiene la fitotoxicidad. De forma general se observó que en aquellos extractos más ricos en azúcares, la producción de lacasa y Mn peroxidasa fue mucho mayor, siendo estos los extractos acuosos I y II obtenidos mediante extracción orbital y los extractos metanol, agua I, II y III obtenidos en soxhlet, así como en aquellos sólidos extractados en los que se usaron solventes incapaces de extraer azúcares, como el acetato de etilo, el metanol y propanol. Se ha comprobado en algunos estudios el hecho de que la producción de este tipo de enzimas parece estar en íntima relación con la cantidad de azúcares. Dentro del aprovechamiento integrado del alpeorujó, la fracción acuosa de este podría emplearse en el marco biotecnológico para la obtención de lacasas fúngicas de alto interés en la industria. Las enzimas hidrolíticas también mostraron una relación con el descenso de la fitotoxicidad, ya que parece ser según estudios de otros autores, que los restos de paredes celulares de los tejidos presentes en el alpeorujó como restos de pulpa y huesos, pueden provocar efectos fitotóxicos en las plantas. La producción hidrolítica fue de forma general, más alta en sustratos sólidos que en extractos líquidos y en estos últimos la mayor producción hidrolítica se manifestó en extractos ricos en azúcares como fueron los medios acuosos.

Los hongos mostraron comportamientos diferentes en función del extracto observándose, en la mayoría de los casos un descenso de la fitotoxicidad como consecuencia de las transformaciones bioquímicas de los compuestos junto a su metabolismo y en muchos casos también se observa una relación entre la reducción del contenido fenólico y la disminución de la fitotoxicidad.

Tanto los azúcares como los fenoles constituyen una fuente de carbono para el metabolismo de los hongos saprobios utilizando una u otra fuente según el tipo de hongo. La incubación de los hongos en el alpeorujó y sus fracciones supuso un descenso del contenido glucídico en la mayoría de los casos y en particular en los extractos acuosos.

El hongo filamentoso del suelo *P. chrysogenum*-10 redujo la fitotoxicidad de los extractos acuoso y metanólico de alpeorujó, dos extractos ricos en azúcares. *P. chrysogenum*-10 disminuyó de forma rápida el contenido de azúcares incrementando la actividad metabólica. Sin embargo y a pesar del incremento de su actividad metabólica, este hongo no produjo enzimas ligninolíticas aunque sí una gran cantidad de enzimas

hidrolíticas, por lo que la acción de estas enzimas parece jugar un papel muy importante en la eliminación de la fitotoxicidad de los extractos acuoso y metanólico de alpeorujó por *P. chrysogenum*-10. A pesar de no producir enzimas ligninolíticos este hongo redujo el nivel de fenoles totales presentes en el extracto metanólico pero no pudo eliminar fenoles como el hidroxitirosol y p-tirosol.

En los residuos sólidos de alpeorujó resultantes de las diferentes extracciones orbitales, este hongo produjo gran cantidad de enzimas hidrolíticas sobre todo endo-GN y endo-XG y utilizó el contenido glucídico del residuo para su desarrollo. Además produjo Mn peroxidasa que probablemente empleó para disminuir drásticamente los fenoles presentes en este residuo. No obstante la producción de enzimas hidrolíticas por *P. chrysogenum*-10 parece el mecanismo principal por el que este hongo, al igual que otros hongos saprobios del suelo, disminuyen la fitotoxicidad de los distintos componentes del alpeorujó.

El hongo *C. rigida* redujo la concentración de fenoles, principalmente en extractos ricos en fenoles (Acetato de etilo I y II y metanol), de los obtenidos por el procedimiento orbital y en todos los extractos obtenidos con soxhlet. En todos los extractos orbitales en los que produjo un descenso en el contenido fenólico no se asoció con un descenso en la fitotoxicidad, posiblemente este hongo no fue capaz de polimerizar los fenoles hasta un nivel lo suficientemente elevado como para impedir su acceso al interior de las plantas o bien los nuevos compuestos generados tras las oxidaciones enzimáticas resultaron fitotóxicos para las plantas. En cambio este hongo redujo la fitotoxicidad y el contenido de fenoles de la mayoría de los extractos obtenidos mediante extracción secuencial en soxhlet, si bien no eliminó completamente los fenoles presentes en el extracto de acetato de etilo ni de propanol determinados mediante HPLC. Además, este hongo en el extracto de propanol sintetizó un compuesto fenólico nuevo como el ácido dihidroximandélico, aunque este compuesto no fue fitotóxico. Por otro lado, *C. rigida* fue capaz de metabolizar el gran contenido de azúcares presentes en el extracto acuoso de alpeorujó traduciéndose en un aumento de su actividad enzimática sobre todo de xiloglucanasas. La gran cantidad de pigmento oscuro existente en el extracto acuoso es rico en xiloglucanos y pudo inducir la actividad xiloglucanasa. Los enzimas hidrolíticos producidos por *C. rigida* también pueden intervenir en la reducción de la fitotoxicidad presente en los extractos acuosos.

En los alpeorujos extractados con los solventes en la secuencia del soxhlet se observó que en sustratos sólidos *C. rigida* transformó los fenoles y sustancias potencialmente tóxicas como restos de paredes celulares, con niveles considerables de actividades ligninolíticas e hidrolíticas, observando una relación entre el descenso fenólico y el descenso de fitotoxicidad en el alpeorujos extractado con acetato de etilo y n-propanol. El alpeorujos extractado con todos los solventes y tratado con *C. rigida* mostró un efecto fertilizante no asociado al descenso fenólico ya que este extracto mostró un bajo contenido en estos compuestos, sin embargo se podría asociar a la intensa actividad hidrolítica en este sustrato, confirmando de nuevo el papel de los restos de paredes celulares en la fitotoxicidad del alpeorujos.

T. versicolor puede considerarse como uno de los hongos más efectivos en la reducción de los efectos fitotóxicos del alpeorujos. Este hongo es conocido por su buen crecimiento en residuos lignocelulósicos, produciendo lacasa y Mn peroxidasa bajo condiciones de cultivo sólidas y líquidas. En todos los extractos realizados de una forma orbital con los diferentes solventes, salvo en el extracto metanólico, produjo una reducción cuantitativa y cualitativa de los fenoles y una reducción de la fitotoxicidad. Este hongo tuvo una gran actividad lacasa, sobre todo en los extractos acuosos del alpeorujos, posiblemente debido a los carbohidratos solubles junto con otro tipo de sustancias presentes en estos extractos y que parecen contribuir al aumento de la producción ligninolítica, lo que sugiere que determinados compuestos inducen la producción de lacasa y en particular aquellos de una naturaleza polar al igual que parece ocurrir en el alpechín. Este hongo también fue el más efectivo en la decoloración del extracto acuoso de alpeorujos en medio MEA y agar, dada su potente maquinaria ligninolítica y su capacidad para transformar los fenoles. En los extractos obtenidos con soxhlet *T. versicolor* también disminuyó la fitotoxicidad de todos los extractos y siendo en la mayoría de los casos el hongo más efectivo en la disminución del contenido fenólico. De hecho se pudo observar que los fenoles de todos los extractos determinados mediante HPLC, desaparecieron tras la incubación con este hongo. El complejo polimérico del extracto acuoso (Agua I) fue la única sustancia que no desapareció con la incubación con este hongo ya que como es sabido se trata de un complejo muy recalcitrante que posiblemente requiere un periodo de tratamiento mayor. Sin embargo *T. versicolor* mostró una escasa actividad hidrolítica en medios líquidos con lo que

podría decirse que su mecanismo de detoxificación se basa exclusivamente en el empleo de enzimas ligninolíticas.

En los respectivos residuos de alpeorujos extractados, redujo la fitotoxicidad de los mismos sin la reducción del contenido fenólico, dada la ausencia de actividad lacasa y los niveles bajos de Mn peroxidasa. En los sustratos sólidos, la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujo extractado se puede deber por tanto exclusivamente a la acción de enzimas hidrolíticas ya que este hongo produjo niveles considerables de actividad endo-GN.

El hongo *Py. cinnabarinus* redujo la cantidad de fenoles de los extractos obtenidos mediante extracción orbital, mostrando una especial capacidad para degradar el hidroxitirosol en la mayoría estos. Al igual que en el resto de hongos ensayados la actividad lacasa fue especialmente importante en extractos acuosos. *Py. cinnabarinus* es un gran productor de enzima lacasa por lo que se ha escogido como modelo de estudio de este enzima. A pesar de esta alta producción enzimática, *Py. cinnabarinus* no redujo la fitotoxicidad de la mayoría de los extractos obtenidos mediante extracción orbital de forma general, sino a determinadas concentraciones.

En los extractos obtenidos mediante soxhlet y tratados con *Py. cinnabarinus* no se observó la relación entre la disminución de la cantidad de fenoles y la disminución de la fitotoxicidad. En todos los extractos de la secuencia eliminó los fenoles detectados mediante HPLC, salvo en el extracto de acetato de etilo, donde permanecieron fenoles como el p-tirosol y un compuesto no identificado, que parecieron intervenir en la fitotoxicidad de este extracto al no reducirse tras la incubación con el hongo. En los extractos acuosos obtenidos mediante soxhlet (Agua I, II y III) este hongo redujo el contenido de fenoles y azúcares de una forma eficaz y además mostró altas actividades hidrolíticas y ligninolíticas. A pesar de las modificaciones de estos parámetros, el tratamiento con *Py. cinnabarinus* produjo reducciones de fitotoxicidad solo a ciertas concentraciones. Posiblemente los productos de las oxidaciones de la lacasa y Mn peroxidasa produjeron esta disminución de la cantidad de fenoles por polimerización sin producir un descenso en la fitotoxicidad y en los casos en los que se observa este descenso fitotóxico que pudo ser debido a la actuación de las enzimas hidrolíticas.

Parece ser que este hongo reduce las sustancias que causan toxicidad a las plantas en los residuos sólidos de alpeorujo obtenidos después de una extracción orbital, de modo que en los residuos de alpeorujo extractado con agua, tratados con el hongo

redujo considerablemente la fitotoxicidad. Esta disminución de la fitotoxicidad en sustratos sólidos obtenidos mediante extracción orbital estuvo relacionado con la actividad lacasa y con la actividad Mn peroxidasa, a pesar de ser un enzima que no se ha observado en este hongo, posiblemente la Mn peroxidasa de este hongo se induce gracias a ciertas sustancias presentes en el alpeorujó.

En los residuos de los alpeorujos obtenidos tras la extracción secuencial con los diferentes solventes, este hongo mostró una intensa actividad lacasa y redujo el contenido fenólico, disminuyendo progresivamente esta producción enzimática a medida que disminuían los fenoles presentes en los distintos residuos obtenidos en la secuencia de extracción, poniendo de manifiesto la inducción que provocan los fenoles del alpeorujó en la producción de lacasa. Esta reducción de la cantidad de fenoles provocó disminuciones de la fitotoxicidad en los alpeorujos extractados con acetato de etilo y n-propanol. Se observó un efecto potenciador de la germinación en el último alpeorujó obtenido tras la extracción secuencial, dada la ausencia de fenoles.

El fraccionamiento físico constituyó una herramienta eficaz para disminuir los efectos fitotóxicos del alpeorujó, de modo que las fracciones físicas de este mostraron una fitotoxicidad menor que el alpeorujó sin tratar, al aplicarlo sobre las plantas de tomate. El biotratamiento con hongos saprobios tanto del suelo como de la madera contribuyó a la eliminación de la fitotoxicidad de las diferentes fracciones del alpeorujó, si bien depende de la fracción de alpeorujó empleada y del tipo de ensayo realizado, así en el extracto acuoso de alpeorujó, *Py. cinnabarinus* fue, de forma general, el hongo que mejor eliminó la fitotoxicidad en plantas cultivada en suelo llegando a mostrar efectos fertilizantes, mientras que en el alpeorujó extractado con agua, el hongo del suelo *P. chrysogenum*-10 fue el que mejor eliminó la fitotoxicidad del alpeorujó. El hongo *T. versicolor*, que eliminó gran cantidad de sustancias tóxicas, mostró ser muy eficaz en la reducción de la fitotoxicidad sobre la germinación de semillas, sin embargo no fue tan efectivo sobre el crecimiento de plantas cultivadas en suelo. *C. rigida* fue el hongo más efectivo en la eliminación de las sustancias fitotóxicas del alpeorujó por diversas estrategias en función de la fracción, siendo el hongo que más propiedades fertilizantes aportó a las fracciones de alpeorujó.

Se puede decir que no hay indicios claros acerca del papel de los fenoles en la fitotoxicidad, tras los resultados variables obtenidos de la aplicación directa del extracto de acetato de etilo a las semillas, a las concentraciones obtenidas en la extracción, a

pesar de ser un extracto constituido exclusivamente por ácidos fenólicos. En cambio la eliminación de fenoles provoca disminución de la fitotoxicidad, como se observa con el extracto acuoso al que previamente se han extraído los fenoles con acetato de etilo y con el extracto acuoso resultante después de la secuencia de extractantes llevada a cabo con soxhlet. Por lo tanto, el efecto fitotóxico está íntimamente ligado a la concentración de fenoles aplicada, ya que una concentración de 17 g de fenoles/kg de alpeorujó inhibió la germinación de semillas, mientras que a partir de concentraciones de 9 g de fenoles /kg de alpeorujó comienza a detectarse germinación. Además, el hecho de que la disminución de la cantidad de fenoles no provoque de una forma generalizada la disminución de la fitotoxicidad, hace pensar que, en extractos coloreados, la determinación fenólica mediante métodos de cuantificación colorimétrica requiere otro tipo de técnicas. Posiblemente, la disminución del contenido fenólico mediante espectrofotometría se asocia, en parte, a una disminución del color de la muestra, ya que estos hongos poseen la capacidad de decolorar las muestras, con lo cual esta técnica detecta la variación de la densidad óptica como consecuencia del cambio de color, además de detectar la modificación de la cantidad de fenoles.

Los bioensayos de germinación para valorar los efectos fitotóxicos de determinados compuestos presentan muchas ventajas frente a otros tipos de bioensayos ya que durante el periodo de germinación hay un metabolismo rápido, transporte de nutrientes y una gran división celular, siendo en este caso las plantas muy susceptibles a los efectos fitotóxicos. Sin embargo, estas técnicas no tienen en cuenta el estadio de desarrollo de las plantas y sobre todo, el papel de los microorganismos del suelo donde se van a desarrollar las plantas. De hecho se ha encontrado que determinados microorganismos rizosféricos pueden aumentar la fitotoxicidad del alpeorujó aplicado al suelo.

Se ha descrito que la fitotoxicidad de un compuesto puede afectar a las plantas de forma diferente en función de la especie de planta o tipo de suelo. En efecto, el extracto acuoso de alpeorujó, por ejemplo, fue más tóxico sobre plantas de alfalfa que de tomate. También se ha observado que las plantas de tomate y alfalfa mostraron un crecimiento menor en suelo no esterilizado y en general los mejores resultados en cuanto a disminución de fitotoxicidad se observaron siempre y cuando se esterilizaba el sustrato. Este fenómeno quizás podría explicarse por la alteración que supone la esterilización del

suelo de los componentes químicos del mismo o la eliminación de microorganismos de este que reaccionan incrementando la sensibilidad de las plantas a elementos fitotóxicos.

La inoculación microbiana de forma simultánea a la aplicación de alpeorujos puede facilitar la acción de transferencia de sustancias fitotóxicas del alpeorujos a las plantas tal y como pudimos comprobar en nuestros ensayos en los que las plantas micorrizadas, tanto con *G. deserticola* como con micorrizas autóctonas, en presencia de alpeorujos mostraron un crecimiento menor. El fraccionamiento físico del alpeorujos modificó el efecto de los hongos arbusculares sobre las plantas. En nuestros ensayos la inoculación del hongo micorrízico *G. deserticola* no solo disminuyó la sensibilidad de las plantas a la fitotoxicidad del extracto acuoso y alpeorujos extractado con agua, sino que aumentó considerablemente el crecimiento de alfalfa y tomate en presencia de bajas dosis de estas fracciones. Hoy en día se desconoce el comportamiento diferente de las micorrizas arbusculares en la sensibilidad de las plantas frente a diferentes fracciones de alpeorujos. Se piensa que al igual que ocurre con los metales pesados o pesticidas en el suelo, las sustancias fitotóxicas presentes en el alpeorujos pueden influir en el incremento de la sensibilidad y/o resistencia que le pueden proporcionar los hongos arbusculares a las plantas. Por otro lado, la efectividad en esta modificación de la sensibilidad a la fitotoxicidad del alpeorujos por el hongo micorrízico depende además del tipo de asociación hongo arbuscular-planta. De hecho los hongos autóctonos no contribuyeron a paliar los efectos fitotóxicos de las fracciones físicas del alpeorujos sobre plantas de alfalfa y solo lo hicieron en tomate cuando este se aplicó a bajas dosis.

Los hongos saprobios disminuyeron la fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujos sobre las plantas ensayadas. El extracto acuoso de alpeorujos incubado con los hongos *Py. cinnabarinus* y *P. chrysogenum*-10 se comportó como un fertilizante cuando se aplicó a dosis bajas en plantas de tomate inoculadas con *G. deserticola* y de alfalfa colonizada por los endófitos arbusculares autóctonos, ya que incrementaron el peso seco de las plantas respecto a las cultivadas en ausencia de alpeorujos. Este efecto potenciador del crecimiento puede deberse a que *Py. cinnabarinus* degrada una gran cantidad de fenoles mediante la producción de lacasa y *P. chrysogenum*-10 aunque no degrada fenoles, sí muestra intensas actividades hidrolíticas en estos extractos, con enzimas que podrían degradar sustancias de naturaleza no fenólica pero fitotóxicas y que, por tanto, al reducir la concentración de sustancias tóxicas del suelo van a permitir que los hongos arbusculares ejerzan su efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas.

Los hongos saprobios no paliaron el efecto inhibitor del extracto acuoso de alpeorajo sobre el porcentaje de micorrización de las plantas ensayadas. Se sabe que los hongos saprobios en su proceso de incubación del alpeorajo y sus fracciones son capaces de disminuir la cantidad de fenoles de estos residuos, por tanto podemos pensar que los fenoles no serían los causantes del descenso en la colonización. Cabe pensar que algún otro tipo de sustancia presente en dicho extracto podría estar inhibiendo la colonización o que algunas sustancias presentes en el alpeorajo actúen a nivel de la germinación de las esporas tal y como se ha observado con sustancias de tipo flavonoide, insecticidas o metales pesados

El residuo procedente de las distintas fracciones del alpeorajo resultó menos fitotóxico que el alpeorajo sin tratar. En este caso las micorrizas no favorecieron el crecimiento de las plantas en presencia del residuo e incluso aumentaron la sensibilidad de las plantas a los mismos probablemente debido a la gran concentración de sustancias tóxicas. Todos los hongos ligninolíticos redujeron la fitotoxicidad del alpeorajo extractado. Pero solo *C. rigida* disminuyó la fitotoxicidad del alpeorajo en plantas colonizadas por *G. deserticola*.

El porcentaje de micorrización, sobre todo de los endofitos autóctonos, disminuyó por la presencia los residuos procedentes de las distintas fracciones del alpeorajo, salvo en el caso del alpeorajo extractado con agua e inoculado con *C. rigida* y *T. versicolor* que aplicado a bajas dosis provocó un aumento en el porcentaje de micorrización.

Parece existir un umbral de toxicidad para el mecanismo de actuación de las micorrizas, tal y como sucede con otros contaminantes que pueden estar presentes en el suelo, de manera que a partir de una cierta toxicidad las micorrizas favorecen la acción de transferencia de las sustancias fitotóxicas del alpeorajo al interior de las plantas o bien aportan resistencia a las plantas frente a los elementos fitotóxicos. Algunos estudios han mostrado como fenoles del tipo flavonoide pueden actuar aumentando o disminuyendo la germinación de esporas en función de la concentración, además están implicados en procesos de regulación de la simbiosis siendo un proceso altamente complejo que no solo depende del tipo de flavonoide sino también de la especie de hongo. El alpeorajo extractado con agua presenta flavonoides, sustancias que se extraen principalmente con solventes como el n-propanol que podrían afectar a las micorrizas disminuyendo el grado de colonización en función de su concentración.

Algunos estudios han mostrado que la biorremediación del alpechín se favorece con varios pretratamientos físicos permitiendo con ello un mejor tratamiento biológico.

La extracción de la fracción fenólica del alpeorujó con acetato de etilo, provocó una disminución de la fitotoxicidad del alpeorujó en plantas de tomate en ensayos de invernadero. Este hecho sugiere que los fenoles extraídos, que fueron principalmente hidroxitirosol, p-tirosol, ácido protocatecuico, ácido dihidroximandélico, ácido vainílico, ácido p-cumárico, monoacetil hidroxitirosol, ácido elenólico, oleuropeina, ligustrósido y luteolina, contribuyen en gran medida a la fitotoxicidad del alpeorujó. A pesar de extraer mayor cantidad de fenoles con el agua que con el acetato de etilo se observaron resultados similares en cuanto a fitotoxicidad en plantas de tomate, lo que indica que el extracto acuoso también contiene parte de las sustancias que se extraen con acetato de etilo y que contribuyen de una forma similar a la fitotoxicidad del alpeorujó.

El tratamiento biológico de las fracciones físicas del alpeorujó con el hongo saprobio *C. rigida* contribuyó a disminuir e incluso a eliminar su fitotoxicidad. Los elementos fitotóxicos del alpeorujó, principalmente fenoles, son muy recalcitrantes y es necesario al menos un periodo de 20 semanas de incubación con hongos saprobios para reducirlos o eliminarlos. Sin embargo el tratamiento físico de este con acetato de etilo o con agua permitió que el hongo saprobio *C. rigida* disminuyera e incluso eliminara la fitotoxicidad del residuo en un periodo de 15-30 días. La combinación de ambos tratamientos, físico y biológico, permitiría, por un lado, la utilización de sustancias de interés industrial presentes en el extracto de acetato de etilo y agua como es el hidroxitirosol, y por otro, acortar el tiempo de detoxificación del residuo sólido mediante la utilización de hongos saprobios.

El alpeorujó y sus fracciones físicas provocan un efecto más drástico en la disminución del peso seco de las plantas cuando se aplica al suelo no esterilizado de forma que ninguno de los tratamientos utilizados en el suelo no esterilizado consiguió eliminar completamente la fitotoxicidad del alpeorujó. La síntesis de sustancias tóxicas en la transformación de los residuos por los microorganismos autóctonos puede explicar este hecho. En efecto, los microorganismos autóctonos existentes en el suelo de nuestros ensayos no permitieron la acción detoxificadora de *C. rigida* sobre el alpeorujó extraído con agua, aunque si disminuyó la fitotoxicidad causada por el alpeorujó extractado con acetato de etilo.

Se observa un paralelismo de los resultados obtenidos en los ensayos de campo con los de invernadero, ya que la aplicación de alpeorujó redujo el crecimiento de las plantas de tomate y el tratamiento físico de extracción con acetato de etilo no eliminó la

fitotoxicidad del residuo en ambos experimentos. Sin embargo, *C. rigida* fue capaz de eliminar la fitotoxicidad del alpeorujó extractado con acetato de etilo en ensayos de campo de forma que tanto el peso seco de la parte aérea como la producción de frutos fue similar al de plantas cultivadas en ausencia de alpeorujó. Hay que destacar que *C. rigida* fue capaz de eliminar la fitotoxicidad del alpeorujó extractado con acetato de etilo después de 30 días de incubación mientras que el hongo saprobio necesitó 20 semanas para producir el mismo efecto en el alpeorujó sin tratar. Este resultado supone una mayor eficacia en la detoxificación del alpeorujó e incrementa la posibilidad de utilizar este residuo como fertilizante.

Conclusiones



CONCLUSIONES

1. El fraccionamiento físico del alpeorujó mostró que la fracción soluble en agua y el residuo sólido resultante fueron tóxicos para las plantas cuando se aplicaron a la dosis agronómica.
2. Se detectaron 25 compuestos de naturaleza fenólica en el alpeorujó poniéndose de manifiesto por primera vez la existencia del 6'- β -ramnopiranosil-oleósido y 6'- β -glucopiranosil-oleósido en este residuo.
3. En la extracción secuencial de alpeorujó, el acetato de etilo extrajo fundamentalmente los fenoles monoméricos incluidos fenoles de interés farmacéutico como el hidroxitirosol y la oleuropeína. El n-propanol extrajo algunos ácidos fenólicos y compuestos de tipo flavonoide y secoiridoide, el metanol fenoles de tipo flavonoide y secoiridoide y el agua fenoles de tipo secoiridoide, flavonoides glicosilados y verbascósidos junto con una mezcla de compuestos coeluidos semejantes a la polimerina del alpechín.
4. La extracción secuencial del alpeorujó con acetato de etilo, n-propanol, metanol y agua eliminó la fitotoxicidad del mismo. La pérdida de fitotoxicidad en las sucesivas extracciones fenólicas permite establecer una relación entre la fitotoxicidad y la presencia de fenoles.
5. Las enzimas ligninolíticas (lacasas y Mn peroxidasas) producidas por los hongos tiene un papel muy importante en el proceso de detoxificación del alpeorujó ya que en la mayoría de los casos se observó una relación estrecha entre el descenso del contenido fenólico, el aumento de la producción de lacasa y Mn peroxidasa y el descenso de la fitotoxicidad.
6. Las enzimas hidrolíticas celulasas, pectinasas y xiloglucanasas producidas por los hongos saprobios también reducen la fitotoxicidad del alpeorujó.
7. Los hongos ligninolíticos *C. rigida*, *T. versicolor* y *Py. cinnabarinus* disminuyeron la fitotoxicidad del alpeorujó principalmente por la acción de las enzimas Mn peroxidasa y

Conclusiones

lacasa mientras que el hongo filamentoso del suelo *P. chrysogenum*-10 disminuyó dicha fitotoxicidad principalmente por la producción de enzimas hidrolíticas pectinasa, glucanasa y xiloglucanasa.

8. El hongo micorrícico *G. deserticola* no solo disminuyó la sensibilidad de las plantas a la fitotoxicidad del extracto acuoso y del alpeorajo extractado con agua, sino que aumentó considerablemente el crecimiento de las plantas en presencia de bajas dosis de estas fracciones. Sin embargo, los hongos autóctonos no contribuyeron a paliar los efectos fitotóxicos de las fracciones físicas del alpeorajo sobre plantas.

9. Los endofitos arbusculares autóctonos fueron mas sensibles a las fracciones físicas del alpeorajo que *G. deserticola*.

10. El tratamiento físico del alpeorajo con acetato de etilo permitió que el hongo saprobio *C. rigida* acortara de 20 a 4 semanas el tiempo necesario para eliminar la fitotoxicidad del residuo sobre plantas, cultivadas tanto en invernadero como en campo.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Sater, M.A., El Said, A.H.M.** 2001. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 47: 15-21.
- 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., Ruíz, M.A., Hidalgo, F.** 1992. Control de elaboración y características analíticas de los productos obtenidos en una línea continua ecológica. *Dossier Oleo* 2: 43-48.
- Albarran, A., Celis, R., Hermosin, M.C., López-Pineiro, A., Cornejo, J.** 2004. Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere* 54: 717-724.
- Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J.** 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* 91: 195-200.
- Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J.** 2006a. Effects of bulking agent on the composting of "alperujo", the solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Process Biochemistry* 41: 127-132.
- Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J.** 2006b. Measuring detoxification and maturity in compost made from "alperujo", the solid by-product of extracting olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64: 470-477.
- Alburquerque, J.A., González, J., García, J., Cegarra, J.** 2006c. Composting of a solid olive-mill by-product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management* 26: 620-626.
- Allen, M.F.** 1982. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on water-movement through *Bouteloua-gracilis* (Hbk) Lag ex Steud. *New Phytologist* 91: 191-196.
- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S.** 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 267-273.
- Amhajji, A., El Jalil, M.H., Faid, M., Vasel, J.L., El Yachioui, M.** 2000. Polyphenol removal from olive mill waste waters by selected mould strains. *Grasas y Aceites* 51: 400-404.
- Ammar E., Ben Rouina B.** 1999. Potential horticultural utilization of olive oil processing waste water. *Acta Horticulture* 474(2): 741-744.

- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R.** 2000. Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry* 68: 283-287.
- Angle, J.S., Heckman, J.R.** 1986. Effect of soil-pH and sewage-sludge on VA mycorrhizal infection of soybeans. *Plant and Soil* 93: 437-441.
- Aragón, J.M., Palancar, M.C.** 2001. *Improlive 2000*. Present and future of Alpeorujó, Editorial Complutense, S.A., Madrid.
- Arjona, R., Ollero, P., Vidal, B.** 2005. Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *Journal of Food Engineering* 68: 239-247.
- Arriagada, C.A., Herrera, M.A., García-Romera, I., Ocampo, J.A.** 2004. Tolerance to Cd of soybean (*Glycine max*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) inoculated with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Symbiosis* 36: 285-299.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Tovar, M.J., Motilva, M.J.** 2006. Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea* L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108: 19-27.
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., Hamdi, M.** 2002. Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 38: 361-365.
- Baborova, P., Moder, M., Baldrian, P., Cajthamlova, K., Cajthaml, T.** 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology* 157: 248-253.
- Bai, Z.H., Zhang, H.X., Qi, H.Y., Peng, X.W., Li, B.J.** 2004. Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Technology* 95: 49-52.
- Baig, M.M.V., Mane, V.P., More, D.R., Shinde, L.P., Baig, M.I.A.** 2003. Utilization of banana agricultural waste: Production of cellulases by soil fungi. *Journal of Environmental Biology* 24: 173-176.
- Baldrian, P.** 2006. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Baldrian, P., Valaskova, V., Merhautova, V., Gabriel, J.** 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology* 156: 670-676.
- Banci, L., Camarero, S., Martinez, A.T., Martinez, M.J., Perez-Boada, M., Pierattelli, R., Ruiz-Duenas, F.J.** 2003. NMR study of manganese(II) binding by a new versatile peroxidase from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8: 751-760.

- Barea, J.M., Azcón, R., Azcón Aguilar, C.** 1993. Mycorrhiza and Crops. En: Advances in Plant Pathology, Vol. 9. Mycorrhiza: A Syntesis, (I. Tommerup, ed.), Academic Press, London, pp. 167-189.
- Bartnicki-García, S.** 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology 22: 87-108.
- Beccari, M., Majone, M., Riccardi, C., Savarese, F., Torrisi, L.** 1999. Integrated treatment of olive oil mill effluents: Effect of chemical and physical pretreatment on anaerobic treatability. Water Science and Technology 40: 347-355.
- Ben Hamman, O., de la Rubia, T., Martínez, J.** 1999. Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavido-alba*. Environmental Toxicology and Chemistry 18: 2410-2415.
- Benítez, F.J., Beltran-Heredia, J., Torregrosa, J., Dominguez, J.R.** 1999. Aerobic treatment of black olive wastewater and the effect of an ozonation stage. Bioprocess Engineering 20: 355-361.
- Benítez, E., Sainz, H., Melgar, R., Nogales, R.** 2002. Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: A pilot scale study. Waste Management and Research 20: 134-142.
- Berk.** 1850. *Trametes trogii*. Histoire Naturelle des Îles Canaries 2: 52.
- Berk. & Mont. Murrill.** 1908. *Corioloropsis rigida*. North American Flora (New York) 9 (II) 75.
- Boer, C.G., Obici, L., de Souza, C.G.M., Peralta, R.M.** 2004. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. Bioresource Technology 94: 107-112.
- Bonari, E., Macchia, M., Angelini, L.G., Ceccarini, L.** 1993. The waste waters from olive oil extration: their influence on the germinative characteristics of some cultivated and weed species. Agricultura Mediterranea 123: 273-280.
- 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.
- Borja, R., Rincón, B., Raposo, F., Alba, J., Martín, A.** 2003. Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of the two-phase olive mill solid waste. Biochemical Engineering Journal 15: 139-145.
- Borja, R., Alba, J., Mancha, A., Martín, A., Alonso, V., Sánchez, E.** 1998. Comparative effect of different aerobic pretreatments on the kinetics and macroenergetic parameters of anaerobic digestion of olive mill wastewater in continuous mode. Bioprocess Engineering 18: 127-134.

- 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.** 1990. Oxidation of nonphenolic substrates- an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267: 99-102.
- Brenes, M., García, A., García, P., Ríos, J.J., Garrido, A.** 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3535-3540.
- Brenes, M., García, A., Ríos, J.J., García, P., Garrido, A.** 2002. Use of 1-EtOAcxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 615-625.
- Bruhlmann, F., Kim, K.S., Zimmerman, W., Fiechter, A.** 1994. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2107-2112.
- Brunetti, G., Plaza, C., Senesi, N.** 2005. Olive pomace amendment in mediterranean conditions: effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6730-6737.
- Bucheli, P., Doares, S.H., Albersheim, P., Darvill, A.** 1990. Host pathogen interactions. XXXVI. Partial-Purification and characterization of heat-labile molecules secreted by the rice blast pathogen that solubilize plant-cell wall fragments that kill plant-cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 159-173.
- Bull.** 1791. *Mucor racemosus*. *Histoire des champignons de la France* 1: 104.
- Burdsall & Eslyn.** 1974. *Phanerochate chrysosporium*. *Mycotaxon* 1(2): 124.
- Buswell, J.A., Odier, E.** 1987. Lignin Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology* 6: 1-60.
- Cabello, M.N.** 1997. Hydrocarbon pollution: Its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology* 22: 233-236.
- Cabrera, F., Madejón, E., Romero, S.A., López, R.** 2002. Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alpeorujos. *Jornadas de investigación y transferencia tecnológica del sector agrícola*. pp. 195-199.
- Cabrera, F., López, R., Martínez-Bordiu, A., de Lome, E.D., Murillo, J.M.** 1996. Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 215-225.
- Camarero, S., Galletti, G.C., Martínez, A.T.** 1994. Preferential degradation of phenolic lignin units by 2 white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4509-4516.
- Capasso, R., De Martino, A., Arienzo, M.** 2002. Recovery and characterization of the metal polymeric organic fraction (Polymerin) from olive oil mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2846-2855.

- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F.** 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste-waters. *Phytochemistry* 31: 4125-4128.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A., Cristinzio, G.** 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste-waters. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 393-398.
- Capasso, R., Pigna, M., De Martino, A., Pucci, M., Sannino, F., Violante, A.** 2004. Potential remediation of waters contaminated with Cr (III), Cu, and Zn by sorption on the organic polymeric fraction of olive mill wastewater (polymerin) and its derivatives. *Environmental Science and Technology* 38: 5170-5176.
- Caputo, A.C., Scacchia, F., Pelagagge, P.M.** 2003. Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering* 23: 197-214.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Azcón, R., Díaz, G., Roldan, A.** 2004a. Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. *Applied Soil Ecology* 25: 169-180.
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Vassileva, M., Díaz, G., Roldan, A.** 2004b. AM fungi inoculation and addition of microbially-treated dry olive cake-enhanced afforestation of a desertified Mediterranean site. *Land Degradation and Development* 15: 153-161.
- Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Lopes da Silva, J.A.** 2003. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate polymers* 52: 125-133.
- Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C.M.G.C., Coimbra, M.A.** 2005. Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 21-32.
- 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.
- Caspersen, S., Sundin, P., Munro, M., Athalsteinsson, S., Hooker, J.E., Jensen, P.** 1999. Interactive effects of lettuce (*Lactuca sativa* L.) irradiance and ferulic acid in axenic hydroponic culture. *Plant and Soil* 210: 115-126.
- Cayuela, M.L., Bernal, M.P., Roig, A.** 2004. Composting olive mill waste and sheep manure for orchard use. *Compost Science and Utilization* 12: 130-136.
- Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A.** 2006. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry* 41: 616-623.
- Cegarra, J., Amor, J.B., González, J., Bernal, M.P., Roig, A.** 2000. Characteristics of a new solid olive-mill-by-product ("alperujo") and its suitability for composting. *Proceedings of the International Composting Symposium ICS 99*, pp. 124-140.

- Celma, A.R., Al-Kassir, A., Mondragao, F.** 2002. Tratamiento energético de alperujos. Energia. www.energuia.com.
- Cereti, C.F., Rossini, F., Federici, F., Quaratino, D., Vassilev, N., Fenice, M.** 2004. Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertiliser for wheat (*Triticum durum* Desf.). Bioresource Technology 91: 135-140.
- Cermola, F., DellaGreca, N., Iesce, M.R., Montella, S., Pollio, A., Temussi, F.** 2004. A mild photochemical approach to the degradation of phenols from olive oil mill wastewater. Chemosphere 55: 1035-1041.
- 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 Biochemistry 35: 557-561.
- Clark, J., Ortego, L.S., Fairbrother, A.** 2004. Sources of variability in plant toxicity testing. Chemosphere 57: 1599-1612.
- Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., Pasta, P.** 1999. Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. Trends in Biotechnology 17: 163-168.
- Cooke, 1885.** *Fomes sclerodermeus*. Grevillea 14 (nº 69): 18.
- Cordier, C., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.** 1996. Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. Plant and Soil 185: 223-232.
- Cox, L., Hermosin, M.C., Cornejo, J.** 2004. Influence of organic amendments on sorption and dissipation of imidacloprid in soil. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 84: 95-102.
- Cox, L., Celis, R., Hermosin, M.C., Becker, A., Cornejo, J.** 1997. Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. Agriculture Ecosystems and Environment 65: 151-161.
- D'Acunzo, F., Galli, C.** 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. European Journal of Biochemistry 270: 3634-3640.
- 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. Journal of Biotechnology 61: 209-218.
- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M., Marabottini, R.** 2004. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. Chemosphere 54: 887-894.
- Das, M.K.L., Prasad, J.S., Ahmad, S.K.** 1997. Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. Letters in Applied Microbiology 25: 313-315.

- Davies, L.C., Novais, J.M., Martins-Dias, S.** 2004. Influence of salts and phenolic compounds on olive mill wastewater detoxification using superabsorbent polymers. *Bioresource Technology* 95: 259-268.
- De la Rubia, T., Ruiz, E., Pérez, J., Martínez, J.** 2002. Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavid-alba* induced by vanillin. *Archives of Microbiology* 179: 70-73.
- De Simone, C., De Marco, A., Raglione, M., D'Ambrosio, C., Pitoni, P.** 1999. Utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione. Tossicità ed influenza su alcune caratteristiche pedologiche. *Rivista di Agronomia* 33: 8-13.
- Dehn, B., Schüepp, H.** 1990. Influence of VA Mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy-metals in plants. *Agriculture Ecosystems and Environment* 29: 79-83.
- Della Greca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., Temussi, F.** 2001. Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 352-359.
- Dhouib, A., Ellouz, M., Aloui, F., Sayadi, S.** 2006. Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Letters in Applied Microbiology* 42: 405-411.
- Di Gioia, D., Fava, F., Bertin, L., Marchetti, L.** 2001. Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 619-626.
- Dias, A.A., Bezerra, R.M., Pereira, A.N.** 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology* 92: 7-13.
- Donnelly, P.K., Fletcher, J.S.** 1994. Potential use of mycorrhizal fungi as bioremediation agents. *Bioremediation through Rhizosphere Technology* 563: 93-99.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Gianfreda, L.** 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 907-931.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson K.E.L.** 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1151-1158
- Eibes, G., Lu-Chau, T., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M.** 2005. Complete degradation of anthracene by manganese peroxidase in organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 365-372.
- El Hadrami, A., Belaqziz, M., El Hassni, M., Hanifi, S., Abbad, A., Capasso, R., Gianfreda, L., El Hadrami, I.** 2004. Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewaters fertirrigation on the growth of some mediterranean crops. *Journal of Agronomy* 3: 247-254.

- Elisashvili, T.A., Borovkov, A.V.** 1975. Optimization of the nutrient medium for the biosynthesis of phytotoxic metabolites of *Myrothecium verrucaria* VKMF-183. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia* 11: 877-879.
- Elisashvili, V., Parlar, H., Kachlishvili, E., Chichua, D., Kvesitadze, G.** 2001. Lignocellulolytic activity of Basidiomycetes grown under submerged and solid-state fermentation on plant raw material. *Advances in Food Sciences* 23: 117-123.
- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P.** 1990. Microbial degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlín-New York, pp. 407.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Sampaio, J.P.** 2001. Basidiomycetous yeasts. En: *The Mycota VII. Part B. Systematics and Evolution* (D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin y P.A. Lemke, eds.), Springer-Verlag, Berlín. pp. 3-35.
- Fengel, D., Wegener, G.** 1984. *Wood Chemistry, Ultrastructure and reactions*. Ed: Walter de Gruyter. Berlín-New York.
- Fenice, M., Sermanni, G.G., Federici, F., D'Annibale, A.** 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology* 100: 77-85.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jiménez, A.** 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6804-6811.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gómez, E., Guillen, R., Jiménez, A., Heredia, A., Rodríguez, R.** 2004. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5849-5855.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A.** 1986. Vegetation water used as fertilizer. En: *International Symposium on Olive by Products Valorization* (FAO, ed.), Sevilla, España. pp. 321-330.
- Filippi, C., Bedini, S., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Saviozzi, A.** 2002. Cocomposting of olive oil mill by-products: Chemical and microbiological evaluations. *Compost Science and Utilization* 10: 63-71.
- Fletcher, J.S., Johnson, F.L., McFarlane, J.C., 1990.** Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 769-776.
- 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 Research* 36: 4735-4744.
- Fr.** 1821 *Phlebia radiata*. *Systema Mycologicum* 1: 427.
- Fracchia, S.** 2002. Hongos saprótrofos del suelo como microorganismos auxiliares de la micorrización. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- Fracchia, S., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J.A.** 2000. Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil* 223: 175-184.
- 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. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1755-1767.
- Fry, S.C.** 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant-cell wall. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 46: 497-520.
- Gallardo-Lara, F., Pérez, J.D.** 1990. Direct, delayed and residual effects of applied wastewater from olive processing in nitrogen and phosphorus availability in the soil-plant system. *Journal of Environmental Science and Health. Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 25: 379-394.
- Galli, C., Visioli, F.** 1999. Antioxidant and other activities of phenolics in olives olive oil, typical components of the mediterranean diet. *Lipids* 34: 23-26.
- Galli, E., Tomati, U., Grappelli, A., Buffone, R.** 1988. Recycle of olive oil waste-waters for *Pleurotus* mycelium production in submerged culture. *Agrochimica* 32: 451-456.
- García-Garrido, J.M., Tribak, M., Rejón-Palomares, A., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 2000. Hydrolytic enzymes and ability of mycorrhizal fungi to colonize roots. *Journal of Experimental Botany* 51: 1443-1448.
- García-Gómez, A., Bernal, M.P., Roig, A.** 2002. Growth of ornamental plants in two composts prepared from agroindustrial wastes. *Bioresource Technology* 83: 81-87.
- García-Gómez, A., Bernal, M.P., Roig, A.** 2005. Organic matter fractions involved in degradation and humification processes during composting. *Compost Science and Utilization* 13: 127-135.
- García-Gómez, 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 Technology* 86: 59-64.
- García-Romera, I., Ocampo, J.A.** 1988. Effect of the herbicide MCPA on VA mycorrhizal infection and growth of *Pisum sativum*. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 151: 225-228.
- García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Martín, J., Fracchia, S., Mujica, M.T., Godeas, A., Ocampo, J.A.** 1998. Interactions between saprotrophic *Fusarium* strains and arbuscular mycorrhizas of soybean plants. *Symbiosis* 24: 235-245.
- George, E., Marschner, H., Jakobsen, I.** 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology* 15: 257-270.
- Geng, X., Li, K.** 2002. Degradation of non-phenolic lignin by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 342-346.

- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M.** 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3: 1-25.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Rao, M.A., Bollag, J.M.** 2003. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Research* 37: 3205-3215.
- Gianinazzi-Pearson, V.** 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *The Plant Cell* 8: 1871-1883.
- Giatti, C., Kirst, G., Farani, D., Peralta, R.M.** 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 44: 129-136.
- Gillet.** 1874. *Pleurotus eryngii*. Les Hyménomycètes ou Description de tous les Champignons (Fungi) qui croissent en France avec l'Indication de leurs Propriétés utiles ou vénéneuses (Alençon).
- Ginos, A., Manios, T., Mantzavinos, D.** 2006. Treatment of olive mill effluents by coagulation-flocculation-hydrogen peroxide oxidation and effect on phytotoxicity. *Journal of Hazardous Materials* 133: 135-142.
- Giovannetti, M., Mosse, B.** 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Gold, M.H., Youngs, H.L., Gelpke, M.D.S.** 2000. Manganese peroxidase. *Metal Ions in Biological Systems* 37: 559-586.
- Gordon, M.H., Paiva-Martins, F., Almeida, M.** 2001. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2480-2485.
- 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. *Journal of Basic Microbiology* 38: 371-382.
- Guillen, R., Heredia, A., Felizón, B., Jiménez, A., Montano, A., Fernández-Bolaños, J.** 1992. Fiber fraction carbohydrates in *Olea-Europaea* (Gordal and Manzanilla Var). *Food Chemistry* 44: 173-178.
- Guneyasu, S., Aydin, S., Arayici, S.** 2004. Removal of some organic acids from water using olive mill wastes as adsorbent. *Fresenius Environmental Bulletin* 13: 1006-1009.
- Hamdi, M.** 1992. Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 37: 155-163.
- Hamdi, M., Khadir, A., García, J.** 1991. The use of *Aspergillus niger* for the bioconversion of olive mill wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34: 828-831.
- Harley J.L., Smith S.E.** 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.

- Hart, H.E., Parish, M.E., Burns, J.K., Wicker, L.** 1991. Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus-oryzae*. *Journal of Food Science* 56: 480-483.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135.
- Hewitt, E.J.** 1966. 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.
- Higuchi, T.** 1990. Lignin biochemistry, biosynthesis and biodegradation. *Wood Sciences Technology* 24: 23-63.
- Hofrichter, M.** 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Hofrichter, M., Scheibner, K.** 1993. Utilization of aromatic-compounds by the *Penicillium* strain Bi-7/2. *Journal of Basic Microbiology* 33: 227-232.
- Hofrichter, M., Bublitz, F., Fritsche, W.** 1995. Cometabolic degradation of o-cresol and 2,6-dimethylphenol by *Penicillium-frequentans* Bi-7/2. *Journal of Basic Microbiology* 35: 303-313.
- Isebaert, S., Haesaert, G., Devreese, R., Maene P., Fremaut, F., Vlaemynck, G.** 2005. *Fusarium* spp. and *Fusarium* mycotoxins in maize: a problem for Flanders?. *Communications in Agricultural Applied Biological Sciences* 70: 129-36.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A.** 2005. Model study on the effect of 15 phenolic olive mill wastewater constituents on seed germination and *Vibrio fischeri* metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8414-8417.
- Jacq. Fr.** 1881. *Pycnoporus cinnabarinus*. *Revue Mycologique*, Toulouse 3: 18.
- 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., Tabka, M.G., Penninckx, M.J.** 2006. Lignin modifying enzymes of *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. *Chemosphere* 62: 1421-1430.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M., Penninckx, M.J.** 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 802-809.
- Jensen, K.A., Bao, W.L., Kawai, S., Srebotnik, E., Hammel, K.E.** 1997. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase (vol 62, pg 3684, 1996). *Applied and Environmental Microbiology* 63: 815-815.

- Jiménez, A., Rodríguez, R., Fernández-Caro, I., Guillen, R., Fernández-Bolaños, J., Heredia, A.** 2001. Olive fruit cell wall: Degradation of pectic polysaccharides during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 409-415.
- Johansson T, Nyman P.O.** 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 49-56.
- Jorgensen, H., Morkeberg, A., Krogh, K.B.R., Olsson, L.** 2005. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 42-48.
- Jurado, F., Cano, A., Carpio, J.** 2003. Modelling of combined cycle power plants using biomass. *Renewable Energy* 28: 743-753.
- Kaddour, S., Bouhache, M., Bouya, D.** 2005. Evolución de la viabilidad de las semillas de jobo (*Orobanche crenata* Forsk.) enterradas en una mezcla de suelo y orujo de oliva, en función de la profundidad y la duración del enterramiento. *Olivae* 103: 42-47.
- Kapoor, K.K., Jain, M.K., Mishra, M.M., Singh, C.P.** 1978. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin and humus formation by cellulolytic fungi. *Annales de Microbiologie B129*: 613-620.
- Keum, Y.S., Li, Q.X.** 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56: 23-30.
- 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 Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 753-759.
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J.** 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207.
- Kirk, T.K., Farrell, R.L.** 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kirk T.K., Higuchi, T., Chang, H.** 1981. Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potencial applications. Vol I and II. CRC Press. Boca Raton. pp. 334.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikus, J.G.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* 117: 227-285.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 221-226.

- Komilis, D.P., Karatzas, E., Halvadakis, C.P.** 2005. The effect of olive mill wastewater on seed germination after various pretreatment techniques. *Journal of Environmental Management* 74: 339-348.
- Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrekhelidze, D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Buadze, O., Zaalishvili, G., Coulston, F.** 2000. Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47: 1-26.
- Lahdesmaki, P., Piispanen, R.** 1988. Degradation products and the hydrolytic enzyme-activities in the soil humification processes. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 287-292.
- 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. *Bioresource Technology* 96: 317-322.
- Lawoko, M., Nutt, A., Henriksson, H., Gellerstedt, G., Henriksson, G.** 2000. Hemicellulase activity of aerobic fungal cellulases. *Holzforschung* 54: 497-500.
- Leatham, G.F.** 1986. The ligninolytic activities of *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24: 51-58.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M., Rogalski, J.** 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- 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 Chemistry* 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-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1775-1787.
- Linderman, R.G., Moore, L.W., Baker, K.F., Cooksey, D.A.** 1983. Strategies for detecting and characterizing systems for biological-control of soilborne plant-pathogens. *Plant Disease* 67: 1058-1064.
- 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*. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 2055-2065.
- Lloyd.** 1921. *Trametes versicolor*. *Mycological Notes*, 65: 1045.
- Lugauskas, A., Stakeniene, J.** 2002. Toxin producing micromycetes on fruit, berries, and vegetables. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9: 183-97.

- Lyu, S.W., Blum, U.** 1990. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K, and water-uptake by cucumber seedlings in a split-root system. *Journal of Chemical Ecology* 16: 2429-2439.
- Lyu, S.W., Blum, U., Gerig, T.M., O'Brien, T.E.** 1990. Effects of mixtures of phenolic-acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 16: 2559-2567.
- Madrid, F., de la Rubia, T., Martínez, J.** 1995. Effect of *Phanerochaete flavido-alba* on aromatic acids in olive oil mill waste waters. *Toxicological and Environmental Chemistry* 51: 161-168.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., Huttermann, A.** 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 335-341.
- Mantzavinos, D., Kalogerakis, N.** 2005. Treatment of olive mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes; an overview. *Environment International* 31: 289-295.
- Marques, I.P.** 2001. Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination* 137: 233-239.
- Martín, C., Manzanares, A.** 1994. Study of decolorization of straw soda pulping effluent by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 47: 209-214.
- 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*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1769-1775.
- Martín-García, I., Yañez-Ruiz, D., Moumen, A., Molina-Alcaide, E.** 2004. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal supply on two-stage olive cake fermentation. *Animal Research* 53: 245-257.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C.** 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, A.T.** 1994. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 500-504.
- Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., Sannia, G.** 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 30: 1914-1918.
- Masghouni, M., Hassairi, M.** 2000. Energy applications of olive-oil industry by-products: I. The exhaust foot cake. *Biomass and Bioenergy* 18: 257-262.
- Mayer, A.M., Harel, E.** 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.

- Mayer, A.M., Staples, R.C.** 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Medina, A., Vassilev, N., Barea, J.M., Azcon, R.** 2005. Application of *Aspergillus niger*-treated agrowaste residue and *Glomus mosseae* for improving growth and nutrition of *Trifolium repens* in a Cd-contaminated soil. *Journal of Biotechnology* 116: 369-378.
- Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S.** 2006a. Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiological Research* 161: 93-101.
- Mekki, A., Dhouib, A., Aloui, F., Sayadi, S.** 2006b. Olive wastewater as an ecological fertiliser. *Agronomy for Sustainable Development* 26: 61-67.
- Menéndez, A., Martínez, A., Chiocchio, V., Venedikian, N., Ocampo, J.A., Godeas, A.** 1999. Influence of the insecticide dimethoate on arbuscular mycorrhizal colonization and growth in soybean plants. *International Microbiology* 2(1): 43-45.
- Michel, F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A., Reddy, C.A.** 1991. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2368-2375.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E.** 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters* 27: 955-959.
- Moldes, D., Lorenzo, M., Sanroman, M.A.** 2004. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology Letters* 26: 327-330.
- Molina, E., Nefzaoui, A.** 1996. Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 227-235.
- Molina, E., Yañez, D.R., Abdelmajid, M.** 2003. Pienso compuesto para alimentación de rumiantes obtenido a partir de orujos secos y extractados procedentes de la extracción del aceite de oliva. Patente nº ES 2180423.
- Morelló, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J.** 2004. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6002-6009.
- Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos Cormenzana, A.** 2004. Antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills. En: *Encyclopedia of environmental control technology*, (P.N. Cheremisinoff, ed.), Gulf Publishing Co., Houston, pp. 731-757.
- Moreno, J., de la Rubia, T., Ramos-Cormenzana, A., Vela, G.R.** 1990. Growth and nitrogenase activity of *Azotobacter-vinelandii* on soil phenolic-acids. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 850-855.

- Mulinacci, N., Innocenti, M., La Marca, G., Mercalli, E., Giaccherini, C., Romani, A., Erica, S., Vincieri, F.F.** 2005. Solid olive residues: Insight into their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8963-8969.
- Nandakumar, L., Rangaswamy, N.S.** 1985. Effect of some flavonoids and phenolic-acids on seed-germination and rooting. *Journal of Experimental Botany* 36: 1313-1319.
- Nees.** 1817. *Fusarium lateritium*. *Das System der Pilze und Schwamme*, 31.
- Nogales, R., Melgar, R., Guerrero, A., Lozada, G., Benítez, E., Thompson, R., Gómez, M.** 1999. Growth and reproduction of *Eisenia andrei* in dry olive cake mixed with other organic wastes. *Pedobiologia* 43: 744-752.
- Ocampo, J.A.** 1993. Pesticide-plant pathogen interactions in crop production: beneficial and deleterious effects. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 214-226.
- Ocampo, J.A., Hayman, D.S.** 1980. Effects of pesticides on mycorrhiza in field-grown barley, maize and potatoes. *Transactions of the British Mycological Society* 74: 413-416.
- Pagnanelli, F., Toro, L., Veglio, F.** 2002. Olive mill solid residues as heavy metal sorbent material: a preliminary study. *Waste Management* 22: 901-907.
- Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P.** 1999. Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* 67: 111-115.
- 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. *Biology and Fertility of Soils* 32: 222-227.
- Pawlowska, T.E., Charvat, I.** 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6643-6649.
- Pedersen, C.T., Safir, G.R., Siqueira, J.O., Parent, S.** 1991. Effect of phenolic-compounds on asparagus mycorrhiza. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 491-494.
- Peláez, F., Martínez, M.J., Martínez, A.T.** 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research* 99: 37-42.
- Pérez, J., de la Rubia, T., Ben Hamman, O., Martínez, J.** 1998. *Phanerochaete flavidoalba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2726-2729.
- 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.

- Pérez, J., Sáez, L., de la Rubia, T., Martínez, J.** 1996. *Phanerochaete flavido-alba* ligninolytic activities and decolorization of partially bio-depurated paper mill wastes. *Water Research* 31: 495-502.
- Pérez, J.D., Gallardo-Lara, F., Esteban, E.** 1980. Aspectos a considerar en el empleo del alpechín como fertilizante. I. Evaluación de su efecto fitotóxico inhibitor de la germinación de semillas. *Cuaderno de Ciencias Biológicas* 59-67.
- Pérez, J.D., Esteban, E., Gómez, M., Gallardo-Lara, F.** 1986. Effects of waste-water from olive processing on seed-germination and early plant-growth of different vegetable species. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 21: 349-357.
- Péris, F.H., Gold, M.H.** 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2240-2245.
- Petre, M., Zarnea, G., Adrian, P., Gheorghiu, E.** 1999. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. *Resources Conservation and Recycling* 27: 309-332.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S.** 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Pointing, S.B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 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*. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 171-179.
- Porcel, R.** 2006. Evaluación de la participación de genes de respuesta al déficit hídrico en el aumento de la tolerancia de las plantas micorrizadas frente a la sequía. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Porcel, R., Ruíz-Lozano, J.M.** 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* 55: 1743-1750.
- Potin, O., Rafin, C., Veignie, E.** 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 45-52.
- Proietti, P., Palliotti, A., Tombesi, A., Cenci, G.** 1995. Chemical and microbiological modifications of two different cultivated soils induced by olive oil wastewater administration. *Agricoltura Mediterranea* 125: 160-171.
- Quél.** 1872. *Pleurotus pulmonarius*. *Mémoires de la Société d'Émulation de Montbéliard*, Série 2, 5: 112.

- Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jimenez B., García-Pareja M.P.** 1996. Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (Alpechín) and biotransformed olive mill waste water. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 283-290
- Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M., López, M.J.** 1995. Bioremediation of alpechin. *International Biodeterioration and Biodegradation* 35: 249-268.
- Ramos Cormenzana, A., García-Pareja, M.P., Garrido-Hoyos, S.E., Martínez-Nieto, L.** 1994. Influence of the oxygen concentration in the phenol content of alpechin degraded by *Aspergillus terreus*. *Congreso Polyphenols*, pp. 94.
- Rasmussen, J.A., Einhellig, F.A.** 1977. Synergistic inhibitory effects of para-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain-sorghum. *Journal of Chemical Ecology* 3: 197-205.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3716-3718.
- Rejón-Palomares, A., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 1996. Presence of xyloglucan-hydrolyzing glucanases (xyloglucanases) in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 21: 249-261.
- Reynolds, T.** 1989. Comparative effects of heterocyclic-compounds on inhibition of lettuce fruit germination. *Journal of Experimental Botany* 40: 391-404.
- Ribereau-Gayon, P.** 1968. *Les Composés Phenoliques des Vegetaux*. Dumond, Paris.
- Ricken, B., Hofner, W.** 1996. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on heavy metal tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L) and oat (*Avena sativa* L) on a sewage-sludge treated soil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 159: 189-194.
- Rinaldi, M., Rana, G., Introna, M.** 2003. Olive-mill wastewater spreading in southern Italy: effects on a durum wheat crop. *Field Crops Research* 84: 319-326.
- Ríos, J.J., Gil, M.J., Gutiérrez-Rosales, F.** 2005. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography* 1093: 167-176.
- Rivas, F.J., Gimeno, O., Portela, J.R., de la Ossa, E.M., Beltran, F.J.** 2001. Supercritical water oxidation of olive oil mill wastewater. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 40: 3670-3674.
- Robles, A., Lucas, R., de Cienfuegos, G.A., Gálvez, A.** 2000. Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 484-490.
- Rodríguez, G.** 2005. Aprovechamiento integral del alpeorujó tratado térmicamente. Desarrollo de un sistema viable para la purificación del antioxidante natural hidroxitiroso. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.

- Rodríguez, M.M., Pérez, J., Ramos-Cormenzana, A., Martínez, J.** 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology* 64: 219-226.
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Hatakka, A.** 1991. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiologica Polonica* 40: 221-234.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero M.A.** 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26: 960-969.
- Romero, M.C., Salvioli, M.L., Cazau, M.C., Arambarri, A.M.** 2002. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environmental Pollution* 117: 159-163.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., Garrido, A.** 2004. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 479-484.
- Rosen, K., Zhong, W.L., Martensson, A.** 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi mediated uptake of Cs-137 in leek and ryegrass. *Science of the Total Environment* 338: 283-290.
- Ruiz, J.C., de la Rubia, T., Pérez, J., López, J.M.** 2002. Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavidobalva*. *FEMS Microbiology Letters* 212: 41-45.
- Ruiz, J.L., Dobao, M.M., Tejada, M., Benítez, M.C., González, J.L.** 1997. Evolución de las propiedades químicas de un suelo tras la adición de distintos tipos de orujo de aceitunas. II Congreso Iberoamericano de Ciencias Hortícolas. Vilamoura, Portugal. pp. 475-481.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J.** 1996. Enzymatic activities of *Trametes versicolor* and *Pleurotus eryngii* implicated in biocontrol of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Current Microbiology* 32: 151-155.
- Ruiz-Lozano, J.M.** 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309-317.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S.** 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* 92: 147-176.
- Saavedra, M., Benitez, E., Cifuentes, C., Nogales, R.** 2006. Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation* 17: 93-102.
- Saiz-Jiménez, C., Gómez-Alarcón, G., Leeuw, J.W.** 1986. Chemical properties of the polymer isolated in fresh vegetation water and sludge evaporation ponds. International Symposium on Olive By-products valorization. Sevilla, Spain.
- Sampedro M.I.** 2005. Disminución de la fitotoxicidad de alpeorujo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España.

- Sampedro, I., D'Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R., García-Romera, I.** 2005. Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* 60: 1393-1400.
- Sampedro, I., Romero, C., Ocampo, J.A., Brenes, M., García, I.** 2004a. Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4487-4492.
- Sampedro, I., Aranda, E., Martín, J., García-Garrido, J.M., García-Romera, I., Ocampo, J.A.** 2004b. Saprobian fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology* 26: 149-156.
- Sánchez, S., Martínez, M.E., Hodaifa, G.** 2004. Utilización del alpechín en la producción de biomasa de *Scenedesmus obliquus*. En: Congreso Nacional de Biotecnología, Biotec 2004, Oviedo, España, pp. 415.
- Santos, V.L., Linardi, V.R.** 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potential. *Process Biochemistry* 39: 1001-1006.
- Saparrat, M.C.N., Guillen, F., Arambarri, A.M., Martínez, A.T., Martínez, M.J.** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1534-1540.
- Saparrat, M.C.N., Martínez, M.J., Tournier, H.A., Cabello, M.N., Arambarri, A.M.** 2000. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 799-803.
- Sarika, R., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D.** 2005. Treatment of olive mill effluents. Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with poly-electrolytes. *Environment International* 31: 297-304.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., Lupetti, A.** 1991. Effects of waste-water from olive processing on agricultural soil. *Agrochimica* 35: 135-148.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1992. Decolourization of olive mill waste waters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Involvement of the lignin degrading system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 813-817.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1993. Screening of white-rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 57: 141-146.
- Sayadi, S., Ellouz, R.** 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1098-1103.
- Sayadi, S., Zorgani, F., Ellouz, R.** 1996. Decolorization of olive mill waste-waters by free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* cultures. Effect of the high-molecular-weight polyphenols. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56: 265-276.

- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., Godeas, A.** 2005a. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal of Plant Physiology* 162: 625-633.
- Scervino, J.M., Ponce, M.A., Erra-Bassells, R., Vierheilig, H., Ocampo, J.A., Godeas, A.** 2005b. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research* 109: 789-794.
- Schltld.** 1824. *Fusarium oxysporum*. *Flora Berolinensis* 2: 139.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C.** 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Schwabe.** 1839. *Fusarium graminearum*. *Flora Anhalt* 2: 285.
- Sierra-Álvarez, R., Dorado, J., Lenon, G., van Beek, T.A., Claasen, F.W., Wijnberg, H.B.P.A.** 2000. Toxicity reduction in pulp and paper industry by fungal biotechnology. *Proceedings of the 4th International Symposium on Biotechnology, Noordwijkerhout*, pp. 584-587.
- Siqueira, J.O., Nair, M.G., Hammerschmidt, R., Safir, G.R.** 1991. Significance of phenolic-compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 63-121.
- Siracusa, G., La Rosa, A.D., Siracusa, V., Trovato, M.** 2001. Eco-compatible use of olive husk as filler in thermoplastic composites. *Journal of Polymers and the Environment* 9: 157-161.
- Smith, S.E., Gianinazzi-Pearson, V., Koide, R., Cairney, J.W.G.** 1994. Nutrient transport in mycorrhizas - structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* 159: 103-113.
- Souza, J.V.B., da Silva, E.S., da Silva, F.T., Paiva, T.C.B.** 2005. Fungal treatment of a delignification effluent from a nitrocellulose industry. *Bioresource Technology* 96: 1936-1942.
- Tatsumi, K., Freyer, A., Minard, R.D., Bollag, J.M.** 1994. Enzyme-mediated coupling of 3,4-dichloroaniline and ferulic acid - A model for pollutant binding to humic materials. *Environmental Science and Technology* 28: 210-215.
- Tekin, A.R., Dalgic, A.C.** 2000. Biogas production from olive pomace. *Resources Conservation and Recycling* 30: 301-313.
- Thom.** 1910. *Penicillium chrysogenum*. *Bulletin of the U.S. Department of Agriculture, Bureau Animal Industry* 118: 58.
- Tien, M., Kirk, T.K.** 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete-chrysosporium* burds. *Science* 221: 661-662.
- Tisdall, J.M., Smith, S.E., Rengasamy, P.** 1997. Aggregation of soil by fungal hyphae. *Australian Journal of Soil Research* 35: 55-60.

- Tomati, U., Galli, E.** 1992. The fertilizing value of waste waters from the olive processing industry. En: Humus, its structure and role in agriculture and environment. (J. Kubat., eds.), Elsevier Science 25: 117-126.
- Trappe, Bloss, J.A. Menge.** 1984. *Glomus deserticola*. Mycotaxon 20(1): 123.
- Tribak, M., Ocampo, J.A., García-Romera, I.** 2002. Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus* and *Pleurotus ostreatus*. Mycologia 94: 404-410.
- 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 Technology 84: 251-257.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A.** 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41: 1-17.
- Ugrekheldze, D., Kvesitadze, G., Arziani, B., Mithaishvili, T., Phiriashvili, V.** 1999. Detoxication of phenol in annual plant seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety 42: 119-124.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcón, R., Fenice, M., Federici, F., Barea, J.M.** 1998. Fertilizing effect of microbially treated olive mill wastewater on *Trifolium* plants. Bioresource Technology 66: 133-137.
- Vaughan, D., Sparling, G.P., Ord, B.G.** 1983. Amelioration of the phytotoxicity of phenolic-acids by some soil microbes. Soil Biology and Biochemistry 15: 613-614.
- Vierheilig, H., Ocampo, JA.** 1991. Susceptibility and effectiveness of VA mycorrhiza in wheat cultivars under different growing conditions. Biology and Fertility of Soils 11: 290-294
- Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Montedoro, G.** 2001. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 1218-1223.
- Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Dellemonache, G., Sermanni, G.G.** 1995. Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinula-edodes*. Bioresource Technology 51: 221-226.
- 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. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 3397-3401.
- Vivas, A., Barea, J.M., Biro, B., Azcón, R.** 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. Journal of Applied Microbiology 100: 587-598.

- Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K.** 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production* 12: 603-611.
- Vlyssides, A., Moutsatsou, A., Mai, S., Barampouti, E.M.** 2005. Effect of oxidation pretreatment by hydrogen peroxide on iron removal from wastewater of a sulfuric acid iron-pickling process. *Environmental Progress* 24: 82-87.
- Volante, A., Lingua, G., Cesaro, P., Cresta, A., Puppo, M., Ariati, L., Berta, G.** 2005. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza* 16: 43-50.
- Wang, T.S.C., Yang, T.K., Chuang, T.T.** 1967. Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Science* 103: 239-246.
- Wang, X., Wang, Y., Chunsheng, Y., Wang, L., Han, S.** 2002. Mechanism-based quantitative structure-phytotoxicity relationships comparative inhibition of substituted phenols on root elongation of *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 29-35.
- Weissenhorn, I., Mench, M., Leyval, C.** 1995. Bioavailability of heavy-metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 287-296.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N.** 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22: 161-187.
- Widden, P., Bisset, J.** 1972. An automatic multichamber soil washing apparatus for removing fungal spores from soil. *Canadian Journal of Microbiology* 18: 1399-1404.
- Whithan, F.H., Blaydes, D.F, Deulin, R.M.** 1971. *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold Company. New York, USA. pp. 55-58.
- Yesilada, E., Ozmen, M., Yesilada, O.** 1999. Studies on the toxic and genotoxic effect of olive oil mill wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin* 8: 732-739.
- Youn, H.D., Hah, Y.C., Kang, S.O.** 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 132: 183-188.
- Yu, H.Y., Zeng, G.M., Huang, G.H., Huang D.L., Chen, Y.N.** 2005 Lignin degradation by *Penicillium simplicissimum*. *Huan Jing Ke Xue* 26: 167-71.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M.** 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22: 54-57.