

TD-EP

N.º Exp.: 1045 H-5
3
2

C/ Camino de Ronces N 130, 4.º A. Granada

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA FACULTAD DE FARMACIA 31 MAYO 1988 REGISTRO DE ENTRADA N.º: 4587
--

TRANSFORMACION MICROBIANA DE
COMPONENTES AROMATICOS
DEL ALPECHIN

610.387663

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA GRANADA N.º Documento 100688 N.º Copia 100692 10.30.1303

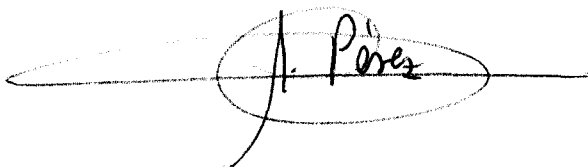
JUANA PEREZ TORRES

UNIVERSIDAD DE GRANADA
1988

D-9-3-8

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE FARMACIA.
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en
Farmacia por la licenciada Juana Pérez Torres.

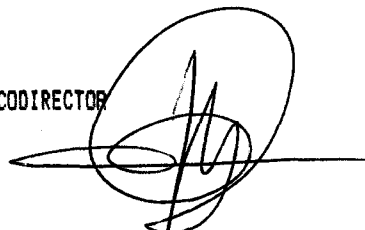
A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Pérez", is written over a horizontal line. The signature is enclosed within a large, hand-drawn oval.

DIRECTOR

A complex, handwritten signature in black ink, likely belonging to Dr. D. Alberto Ramos Cornenzana, is written over a horizontal line. The signature is enclosed within a large, hand-drawn oval.

Dr. D. Alberto Ramos Cornenzana
Catedrático de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada.

CODIRECTOR

A complex, handwritten signature in black ink, likely belonging to Dr. D. José Martínez López, is written over a horizontal line. The signature is enclosed within a large, hand-drawn oval.

Dr. D. José Martínez López
Profesor Titular de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada.

INTRODUCCION

I . ALPECHIN

En el proceso de extracción del aceite de oliva son varios los residuos que se originan, los sólidos, denominados orujos grasos, están constituidos por restos de huesos y pulpa de aceituna, y los líquidos, llamados alpechín o jamila, que constituyen del 40 al 50 % de la aceituna.

El alpechín es un líquido de color marrón oscuro, más o menos negruzco, que presenta un olor fétido característico y suele llevar en suspensión restos de pulpa triturados y en emulsión una cierta cantidad de aceite (alrededor de 0,5%).

I.1 PROBLEMATICA DEL ALPECHIN

Este residuo es altamente contaminante debido a su concentración en sustancias orgánicas, determinante de su gran demanda química de oxígeno del orden de 100g/l en residuos obtenidos por sistema continuo y de 25 g/l en los obtenidos por el sistema tradicional (Fiestas Ros de Ursinos, 1986). Estos altos requerimientos de oxígeno hacen que su vertido a los ríos produzca graves problemas de contaminaciones y rotura del equilibrio ecológico de las aguas receptoras (Fiestas Ros de Ursinos, 1977a y Vilchez Quero, 1982).

Los problemas negativos de su vertido han sido ya expuestos en numerosas publicaciones (Fiestas Ros de Ursinos, 1958b y De Andrés Conde y García García, 1982) y los casos de contaminación de los ríos andaluces son frecuentes a pesar de que la legislación vigente prohíbe terminantemente su vertido a los cauces públicos.

No es España el único país afectado por este grave problema sino que atañe también a Francia (Gante, 1978), Italia (Ielmini *et al* 1976; Balice *et al*, 1986; Vaccarino *et al* , 1986; Franzione *et al*, 1986), Portugal (Raimundo & Oliveira, 1976; Mota & Figueiro, 1986), Turquía (Curi *et al*, 1980; MÖzzinoglu y Uslu, 1986) y Tunes, (Friâa *et al*, 1986).

I.1.1. SISTEMAS DE ELIMINACION PROPUESTOS

Son muchos los métodos que se han propuesto hasta el presente tanto para su aprovechamiento como para su eliminación, si bien tenemos que reseñar que en España son dos los únicos utilizados a nivel industrial, la evacuación en balsas de evaporación y la concentración térmica en algunas almazaras.

I. 1.1.1. EVACUACION EN BALSAS

Consiste en verter alpechín en balsas o lagunas donde se deja que se evapore. La legislación española de 1982 declara de utilidad pública cuantos dispositivos sirvan para la neutralización o eliminación de los alpechines producidos en las almazaras, subvencionando hasta el 60% para que se evite el vertido.

Esta es la posibilidad más generalizada en la actualidad a pesar de los inconvenientes ambientales: malos olores y gran proliferación de insectos.

El problema fundamental que conlleva es que se precisan balsas en los lugares adecuados y a veces la gran producción de aceite determina un progresivo aumento en el número de balsas. A éste se le une el que las almazaras, sobre todo por el problema económico, fabrican a veces balsas de más de 50-100 cm de profundidad, con objeto de reducir la superficie de terreno utilizado. De esta forma, la capacidad de evaporación disminuye con lo que es frecuente la persistencia de residuos concentrados de una campaña a la siguiente y se producen las fermentaciones causantes de los malos olores (Fiestas Ros de Ursinos, 1977a).

Este sistema de eliminación implica además otro inconveniente: la no impermeabilización de las balsas provoca a veces contaminaciones en aguas subterráneas trasladando el problema que intentamos evitar en las aguas al suelo.

Por todo lo anterior es fácilmente deducible que esta es una solución que resultó válida en su momento para impedir la contaminación de los ríos, pero que con el tiempo ha generado una nueva problemática.

I.1.1.2. VERTIDO SOBRE EL TERRENO PARA SU EVAPORACION Y PERCOLACION

Según Fiestas Ros de Ursinos (1977a) ha sido el sistema más utilizado en otros países. El principal problema es la posible contaminación de las aguas subterráneas, además de la evidente contaminación del suelo.

En la actualidad existen algunos estudios del efecto que a corto plazo provoca el vertido sobre el terreno (Escolano Bueno, 1975; Paredes *et al*, 1987a y 1987b), sin embargo, nada se ha investigado a largo plazo.

I.1.1.3. INCINERACION

Este sistema fue propuesto por Arpino y Carola en 1978. Consiste en la incineración del residuo empleando combustibles tradicionales o con el propio orujo producido en la almazara.

Este método no ha sido utilizado en nuestro país.

I.1.1.4. DEPURACION

Consiste en aplicar alguna técnica de depuración antes de su vertido a los cauces públicos. Se obtiene por un lado el residuo concentrado y por otro agua más o menos tratada que se puede reutilizar. Los métodos propuestos se pueden clasificar:

I.1.1.4.1. Métodos físico-químicos

En general estas técnicas son bastante eficaces, sin embargo no utilizables a nivel industrial debido a su alto costo de instalación y mantenimiento.

a) Ultrafiltración

Se lleva a cabo a través de membranas de acetato de celulosa de diferente porosidad acopladas a otros métodos de depuración (Carrieri, 1978). El grave problema de esta técnica consiste en la formación de geles casi impermeables en las membranas.

b) Osmosis inversa

Es una de las técnicas preferidas para la recuperación de aguas de alta pureza de recursos de agua sin refinar. Este método presenta un gran inconveniente, la acumulación progresiva de sustancias en la superficie de la membrana (Ridgnay *et al*, 1983).

c) Electrodialisis

Consiste en la eliminación de compuestos iónicos mediante la acción combinada de membranas semipermeables y campos eléctricos.

d) Criogénesis

Consiste en la utilización de una columna criogénica donde se enfría el alpechín, con lo cual el agua forma unos cristales de hielo y se separa así de las sustancias en suspensión y solución. Esta técnica requiere relativamente poca energía, permite la reutilización del agua y no altera las sustancias termolábiles (Franziona *et al*, 1986).

e) Evaporación múltiple

Con este nuevo procedimiento la almazara podría recuperar distintos productos que se están eliminando en el alpechín (Valenzuela, 1986). Consiste en procesar el residuo en un evaporador obteniéndose dos productos finales: agua con ácidos volátiles y "jugo" concentrado. Además, consta de un sistema adicional para la recuperación del aceite.

Según su autor, el agua puede seguir dos caminos; uso directo mediante su depuración completa y uso indirecto mediante intercambio calórico. La depuración consiste fundamentalmente en eliminar los ácidos orgánicos volátiles. Por otro lado, el intercambio con agua potable permitiría reciclar el agua caliente recuperada. El concentrado se elimina con el orujo.

Este sistema ha sido recientemente comercializado con alguna modificación.

I.1.1.4.2. Métodos químicos

a) Columnas de cloración

Estas columnas producen una oxidación de las sustancias orgánicas. No existen datos suficientes para hacer el balance de esta técnica.

b) Adsorción con distintos hidróxidos

Fiestas Ros de Ursinos (1977a) ensayó el efecto de la adición de óxido de calcio y sales de aluminio y de hierro. Lo único que dio resultados en principio aprovechables para la depuración fue la adición de óxido de calcio. Sin embargo, este sistema tiene poco interés debido a la aparición de "fangos" que suponen un nuevo problema.

I.1.1.4.3. Métodos biológicos

a) Depuración aerobia

Consiste en eliminar compuestos orgánicos con ayuda de microorganismos autóctonos o previamente seleccionados, en presencia de oxígeno.

A pesar de que es un sistema comúnmente empleado en aguas residuales urbanas con gran éxito, en el caso del alpechín no es eficaz ya que el producto final conserva una DBO demasiado elevada como para ser vertida a los cursos de las aguas.

b) Depuración anaerobia

En este caso las sustancias orgánicas se descomponen en ausencia de oxígeno. La rotura de las moléculas se efectúa por reacciones enzimático-hidrolíticas, seguida de reacciones de óxido-fermentación. Estas reacciones se llevan a cabo por las bacterias acidogénicas liberando ácidos orgánicos (del tipo del fórmico o del acético) que posteriormente pueden ser utilizados por las bacterias metanogénicas para la producción de metano. Esta depuración generalmente va encaminada hacia la obtención de biogás, para su utilización como combustible y ha sido objeto de una patente.

Según Fiestas Ros de Ursinos (1982) la obtención del aceite de oliva puede llegar a ser autosuficiente desde el punto de vista energético, pues se puede conseguir el biogás necesario para el funcionamiento de la instalación, además de la depuración de estas aguas residuales.

Sin embargo, otros investigadores han encontrado problemas importantes en esta metodología (Aveni, 1984).

I.1.2. SISTEMAS DE APROVECHAMIENTO

I.1.2.1. UTILIZACIÓN COMO FERTILIZANTE

El contenido mineral del alpechín puede ser utilizado directamente o después de un tratamiento biotecnológico.

I.1.2.1.1. Utilización directa

El fundamento de su empleo como fertilizante reside en su alto contenido en potasio y otros elementos en menor cantidad.

Como inconvenientes de este residuo se pueden citar: el aumento de salinidad del suelo (Paredes *et al*, 1986) tras el contacto con el residuo; su bajo pH acidifica rápidamente los suelos ácidos y neutros pero poco después los ácidos orgánicos responsables de este pH se oxidan dando lugar a CO₂, el cual reacciona con las sales del suelo dando carbonatos neutros, por lo que esta acidificación queda en parte

compensada. Un gran inconveniente es su gran contenido en polifenoles que tienen un marcado efecto fitotóxico.

Con objeto de paliar los inconveniente anteriores, se han hecho las siguientes recomendaciones para su uso (Morisot, 1979 y Fiestas Ros de Ursinos, 1986):

Aplicar el residuo entre líneas de árboles.

La dosis no debe exceder de 30 m³/hectárea y año.

Debe transcurrir al menos un mes desde el final de la aplicación y el principio de la siembra.

No se debe añadir en el periodo de germinación.

De cualquier forma es importante saber que se deben considerar otros factores al aplicarlo como fertilizante. Se ha descrito que se pueden provocar deficiencias en algún nutriente como el nitrógeno, como consecuencia de su inmovilización (Torres *et al.*, 1980) y un efecto fitotóxico capaz de provocar la inhibición de la germinación de semillas (Pérez *et al.*, 1980).

Por otro lado nuestro grupo de trabajo ha detectado la disminución de la población autóctona de bacterias esporuladas y el incremento de la flora desnitrificante tras un periodo de contaminación masiva del suelo (Paredes *et al.*, 1986).

I.1.2.1.2. Producción de compost

Consiste en una evaporación del alpechín por vía natural o por cualquier otra metodología. El concentrado final se puede utilizar sólo o mezclado con otros materiales lignocelulósicos (tales como el orujo de la aceituna).

Para la preparación de este compost el concentrado se inocula con cultivos puros de bacterias, actinomicetos y hongos, obien se mezclan con lodos residuales. Este preparado debe estar bien estabilizado para la obtención de un producto del tipo del humus que pueda ser utilizado directamente sin pretratamientos y sin daño alguno para los cultivos (Bertoldi *et al.*, 1986).

Actualmente en España existe comercializado un compost obtenido vía aeróbica del alpechín (Montaño & Segura, 1986).

I.1.2.2. OBTENCION DE LEVADURAS PIENSO

Fiestas Ros de Ursinos (1958a) considera el alpechín como un sustrato adecuado para el crecimiento de una levadura alimenticia, *Torulopsis utilis*. La ventaja principal respecto de otros residuos es su gran contenido en azúcares asimilables directamente sin requerimiento de hidrólisis previa. El único requisito como sustrato consiste en en la adición de nitrógeno. Los resultados obtenidos permitieron la obtención de una patente y el desarrollo de un planta comercial.

En este sentido, Vitagliano (1975) propuso la utilización directa del alpechín como pienso complementario en la alimentación del ganado.

I.1.2.3. UTILIZACION EN LA CONSTRUCCION

Se han construido sobre todo carreteras en regiones con climasy suelos diferentes dando buenos resultados. Se ha utilizado en Túnez para compactar suelos. Se obtienen suelos impermeables al ascenso del agua por capilaridad y se mejoran sus caracteísticas físicas y mecánicas, principalmente en presencia de calor (Friåa et al., 1986).

I.1.2.4. OBTENCION DE BIOGAS

Este método ha sido comentado en el apartado 1.2.4.3.b de este capítulo.

I.1.3. NUEVAS PERSPECTIVAS

I.1.3.1. OBTENCION DE MICROALGAS

Esta técnica consiste en utilizar alpechín como sustrato para el crecimiento de microalgas ricas en proteínas, apropiadas para su uso como pienso (Fiestas Ros de Ursinos, 1986).

I.1.3.2. CONCENTRACION TERMICA DE LOS EFLUENTES DE LA DIGESTION ANAEROBIA

El biogas en la fermentación es suficiente para evaporar el efluente. Se evapora prácticamente toda el agua quedando un concentrado que ocupa el 5% del volumen inicial (Fiestas Ros de Ursinos, 1986).

I.2. COMPOSICION QUIMICA

Por tratarse el alpechín de un producto natural su composición química es muy variable dependiendo de un gran número de factores: variedad de la aceituna, tierras de cultivo, condiciones climatológicas, abonado, época de recolección, sistemas de extracción del aceite, etc. Sin embargo este aspecto del residuo ha sido el más estudiado y puede hablarse de una composición semicuantitativa representativa (Martínez *et al.*, 1986; Ramos Cormenzana, 1986).

El componente mayoritario es el agua cuantificada en una proporción mayor del 80%. En solución, emulsión y/o suspensión se encuentran fundamentalmente sustancias orgánicas (aproximadamente en un 15%) y una importante proporción de sustancias inorgánicas.

Entre las sustancias orgánicas (Fiestas Ros de Ursinos, 1986) podemos destacar:

Azúcares	2,0-8,0%
Sustancias nitrogenadas	1,2-2,4%
Acidos orgánicos	0,5-1,5%
Polialcoholes	1,0-1,5%
Pectinas, mucílagos y taninos	1,0-1,5%
Grasas	0,03-1,0%
Polifenoles	0,3-0,8%

De entre su contenido salino destacan cantidades de potasio, fósforo y manganeso, motores de la investigación encaminada a su aprovechamiento como abono (apartado I.1.2.1. de este capítulo).

De las características físico-químicas es importante resaltar su pH (4,0-5,5,5) y su gran capacidad antiespumante (factor favorable en los procesos de fermentación) y una alta conductividad.

De todos los componentes descritos en el alpechín, merecen la atención especial los de naturaleza fenólica por su repercusión en tres propiedades importantes de residuo: el efecto fitotóxico, aunque este se ha encontrado tanto en la fracción orgánica como en la mineral (Pérez *et al.*, 1980), el efecto antibacteriano (Rodríguez *et al.*, 1986) y la coloración negruzca de gran recalcitrancia.

En la fracción fenólica se han recogido distintas composiciones por distintos grupos, resultados probablemente influidos por las aceitunas utilizadas, tipo de almazara, fecha, etc. (Ragazzi & Veronesse, 1967; Vazquez Roncero *et al.*, 1974; Balice & Cera, 1984; Rodríguez *et al.*, 1987). Tales son las diferencias entre estos resultados que mientras para ciertos investigadores el ácido cafeico es especialmente abundante (Vazquez Roncero *et al.*, 1974), otros lo sitúan en quinto lugar en su cantidad (Balice and Cera, 1974).

Entre los fenoles de tipo flavonoide se encuentran distintos representantes, como son la pirocatequina, cianidina (Ragazzi & Veronesse, 1967), apigenina, flavanona, luteolina y quercetina (Vazquez Roncero *et al.*, 1974), así como algunos derivados glucosilados de estos. En este grupo de compuestos se encuentran representantes de moléculas importantes por distintos motivos. Así, las de tipo antociánico (cianidina y derivados) están siendo investigadas por su posible utilidad como colorantes para su empleo en alimentación (Markakis, 1982). Así mismo, a sus modificaciones de coloración en función del pH (Brouillard, 1982) se le deben algunas de las propiedades de coloración del alpechín.

Por otro lado, quizá el contenido fenólico más característico del alpechín es el que refleja su coloración, más o menos negruzca que es debida a un pigmento o grupo de ellos de naturaleza fundamentalmente fenólica a la que aparecen unidos restos glucosídicos, proteicos u lipídicos (Ragazzi *et al.*, 1967; Sáinz Jiménez *et al.*, 1986).

En el alpechín por tanto existen una gran variedad de fenoles libres de bajo peso molecular y polimerizados.

Los de bajo peso molecular parecen ser los responsables del efecto fitotóxico, y a ellos hemos podido atribuir el efecto antibacteriano (Rodríguez *et al*, 1987). Por otro lado los de alto peso molecular son los que provocan el color característico de estos residuos que como se verá carecen de efecto antimicrobiano.

I.2.1. EFECTO FITOTOXICO

Como se ha indicado en el apartado I.1.2.1, uno de los métodos propuestos para el aprovechamiento del alpechín es su empleo como fertilizante, sin embargo, presenta inconvenientes como es el efecto inhibidor de la germinación de semillas (Pérez *et al*, 1980; 1986). Este efecto ha sido descrito también para otros residuos orgánicos.

Pérez *et al* (1980 y 1986) demostraron que el alpechín inhibe totalmente la germinación de cebada, rábano, rye-grass, tomate, guisante y judía. El efecto inhibidor no se debe por separado, exclusivamente a sus constituyentes orgánicos o a su alta conductividad, sino a ambas cosas. De forma aislada la contribución proporcional de la parte orgánica es mayor que la de la salinidad y ninguno de estos factores inhibe en el grado que lo hace el alpechín natural, resultando evidente una potenciación mutua cuando actúan conjuntamente.

Aunque hasta el momento no existe ninguna referencia que atribuya el efecto inhibidor de la germinación de semillas a su contenido en compuestos fenólicos, sin embargo dicho efecto se suele asociar en parte a la presencia en el alpechín de estas sustancias en gran concentración (Fiestas Ros de Ursinos, 1986).

Por otro lado, Wang *et al* (1967) observaron que existía una relación entre el contenido de ácidos fenólicos en suelos y la disminución en el crecimiento de los cultivos. Esta relación ya había sido descrita por Walters (1917) y Witehead (1964). Wang *et al* (1967) a la vista de la anterior observación estudiaron el efecto fitotóxico de 5 ácidos fenólicos: ácidos cumárico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, vanillico y siríngico. Estos autores encuentran que los compuestos fenólicos inhiben el crecimiento de semillas de maíz, trigo y soja y en

menor grado la caña de azúcar, si se utilizan a la misma concentración en la que se encuentran en algunos suelos de Taiwan. Los ácidos vanílicico y siríngico han sido descritos en el alpechín (Balice & Cera, 1984), por lo que el efecto inhibitor podría deberse entre otros compuestos a estos fenoles.

I.2.2. EFECTO ANTIBACTERIANO

Desde hace bastantes años, tanto en nuestro laboratorio (Tormo Díaz, 1980) como en otros (Mónica *et al.*, 1980) se venían investigando ciertas modificaciones del alpechín provocadas por el contacto con el suelo. Sin embargo, y a pesar de que uno de los métodos de aprovechamiento del residuo consiste en su vertido sobre el terreno (Escolano Bueno, 1975; Fiestas Ros de Ursinos, 1977a), nada se había estudiado sobre las modificaciones microbiológicas del suelo provocadas por una contaminación masiva por alpechín. Por esta razón en nuestro departamento se iniciaron una serie de estudios encaminados a la investigación de estas alteraciones, así como la posible capacidad de recuperación de estos suelos en el transcurso del tiempo. Así se pudo constatar que después de un episodio de contaminación fuerte tanto en condiciones de campo (Paredes *et al.*, 1986), como en el laboratorio y con preparaciones diluidas de alpechín (Moreno *et al.*, 1987), se produce un incremento general de la actividad microbiana del suelo (Paredes *et al.*, 1986) tal y como había sido sugerido por otros autores (Potenz *et al.*, 1980; Torres Martín *et al.*, 1980), y la disminución del número de bacterias esporuladas (Paredes *et al.*, 1986). Además, la distinta proporción demostrada en los incrementos de bacterias desnitrificantes respecto a las nitrificantes permitía suponer su implicación en el fenómeno de inmovilización del nitrógeno del suelo ya comentado (Torres Martín, 1980).

Quando el suelo objeto de estudio se dejó en recuperación durante un periodo de tiempo similar al de contaminación pudo apreciarse cierto grado de recuperación de las características primitivas, como fueron las disminuciones del contenido en sodio y potasio, los recuentos de la microflora del ciclo del nitrógeno y el incremento del número de bacterias esporuladas.

En el estudio de la colección de microorganismos representativos de ambas muestras se detectó el incremento del grupo corineforme y la disminución de *Bacillus* en el suelo contaminado (Paredes *et al.*, 1986). Pensamos que la disminución de *Bacillus* podría deberse, entre otras posibles causas a una mayor susceptibilidad a los efectos antimicrobianos del alpechín.

La actividad antibacteriana fue descrita por De Caro y Galamini Ligori ((1959). Estos autores indicaban que se trata de componentes no volátiles solubles en agua, que aparecen en el alpechín reciente y que se modifican con el paso del tiempo a pesar de lo cual es detectable su actividad antibiótica en alpechines conservados durante cinco años.

Más tarde Ragazzi y Veronesse (1967) indicaron que esta actividad podría asignarse al tirosol e hidroxitirosol (derivados de la hidrólisis de la oleuropeína) por presentar unos Rf muy semejantes a los obtenidos por De Caro y Galamini Ligori (1959) para sus extractos antibacterianos.

Este factor antibacteriano presente en el alpechín, probablemente sea atribuible más a la mezcla de fenoles de bajo peso molecular que se encuentran en el residuo, que a uno solo de sus componentes, puesto que si bien se ha encontrado oleuropeína (Vazquez Roncero *et al.*, 1974), el glucósido antibacteriano por excelencia del olivo (Cruess & Alberg, 1934; Fleming *et al.*, 1969; 1973; Fleming & Etchells, 1967; Juven *et al.*, 1968 a y b; Kubo *et al.*, 1985), los únicos estudios de esta actividad han sido realizados por nuestro grupo y no hemos podido demostrar relación alguna entre ambos parámetros. Sin embargo si hemos demostrado que la potencia antibiótica aumenta por hidrólisis de los restos azucarados (lo que sugiere la naturaleza glucosídica de los precursores del antimicrobiano), con el incremento notable en los extractos de los fenoles detectables, lo cual impide por el momento asignar a un componente concreto de dicha mezcla el efecto antimicrobiano (Rodríguez *et al.*, 1987).

I.2.3. COLORACION, PIGMENTO

Quizá el contenido fenólico más característico del alpechín sea el que se refleja en su coloración más o menos negruzca (Ragazzi *et al.*, 1967).

Hasta 1967, en que Ragazzi *et al.* aislaron y estudiaron por primera vez el pigmento del alpechín. Estos autores tras repetidas precipitaciones con acetona y metanol, separaron del residuo concentrado, una fracción que contenía la práctica totalidad del pigmento. Después de una serie de purificaciones preliminares precipitaron el pigmento con bromuro de cetil-trimetil amonio. Este precipitado disuelto en alcohol metílico se trataba con NaCl o un ácido para obtener la forma sódica o ácida respectivamente. La primera es fácilmente soluble en agua, mientras que la segunda es insoluble.

Por su capacidad de precipitar con sales de amonio cuaternario de cadena larga, la incapacidad de difundir a través de membranas semipermeables y la medida de su viscosidad intrínseca se le atribuyó una estructura macromolecular a este pigmento.

De los estudios de exclusión molecular dedujeron que este pigmento está constituido por tres fracciones:

- Una que representa el 70% con un peso molecular en torno a 100000.

- Otra que supone el 20%, con un peso molecular valorado entre 50000 y 100000.

- El 10% restante tiene un Pm entre 100000 y 200000.

El pigmento en forma sódica fue hidrolizado con ácido sulfúrico dando una sustancia de color rojo-oscuro insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos y en soluciones alcalinas. En el líquido de hidrólisis y por cromatografía en papel se detectó glucosa y ramnosa, acompañadas de una pequeña cantidad de galactosa y arabinosa. El precipitado rojo-oscuro por tanto es el pigmento sin los azúcares y resulta tener y un Pm de aproximadamente 50000.

Este mismo precipitado sometido a pirólisis evidenció la presencia de ácido protocatéquico y ácido salicílico.

Por todas las experiencias anteriores se le atribuye al pigmento la estructura de "catecolmelanina".

Las melaninas derivadas de la polimerización oxidativa de o-difenoles y designadas como catecolmelaninas están ampliamente difundidas en la naturaleza. Estas son aisladas normalmente en forma de polvo marrón e insolubles en agua. Sin embargo en nuestro caso es una macromolécula ligada a azúcares y soluble en agua y no en forma de gránulos como es normal en este tipo de melaninas.

Si se controla la pulpa de la aceituna en varias épocas se observa que el pigmento no se forma como tal hasta que ésta no sufre alguna lesión. Cierta cantidad de este pigmento se encuentra en las aceitunas maduras conservadas durante largo tiempo que han podido sufrir cualquier tipo de lesión.

Es conocido que la pasta de resultante de la molturación de las aceitunas cambia de color con el curso de las operaciones llevadas a cabo en la extracción del aceite. Dado que la aceituna contiene o-difenoles y fenoloxidasas el pigmento podía originarse por la acción del enzima sobre los fenoles.

Así mismo, Ragazzi *et al* (1967) realizaron el análisis elemental de las distintas formas del pigmento. Los resultados de la forma ácida se expresan en la tabla 1.

En 1986 aparece el segundo estudio sobre el pigmento marrón el pigmento marrón del alpechín (Sáinz Jiménez *et al*, 1986). Estos autores utilizaron una técnica de extracción distinta. Tras eliminar los restos sólidos por centrifugación los sobrenadantes se llevaron a pH 10 y se filtraron. Tras centrifugar de nuevo se acidificaron los sobrenadantes (pH 2). El precipitado fue lavado varias veces con HCl 1N, se dializó y se desecó. De los análisis elementales resultó la composición que aparece en la tabla 1.

Por hidrólisis ácida se separaron los siguientes azúcares: galactosa, ribosa, arabinosa, xylosa, manosa, ramnosa y glucosa, siendo estos dos últimos los mayoritarios.

Así mismo se detectaron un total de 18 aminoácidos resultando los mayoritarios: ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y glicina.

También se detectaron los siguientes fenoles: ácido protocatéquico, ácido cafeico y ácido p-cumárico.

Tabla 1. Análisis elemental de la molécula de pigmento.

	Proporción (%)					
	C	H	N	OCH ₃	S	O
A	50,86	5,09	2,43	2,57	-	-
B	62,50	3,40	8,50	-	0,30	25,3

A; Ragazzi *et al.*, 1967

B; Sáinz Jiménez *et al.*, 1985.

El espectro de infrarrojos sugiere en general gran cantidad de componentes alifáticos pero también hay bandas atribuibles a los compuestos aromáticos.

El fraccionamiento de la molécula usando Sephadex G-100 da dos fracciones; una que representa el 36% del total y otra el 64%.

Por todos los resultados expuestos se demostró que el pigmento del alpechín es un polímero complejo, compuesto por polisacáridos, monosacáridos, fenoles libres y poliméricos (ligninas), otros polifenoles tales como flavonoides y antocianinas, detectándose también proteínas, lípidos y metales en forma de sales.

Según estos autores la teoría de la formación del pigmento por actuación de la fenoloxidasa sobre la oleocianina (Ragazzi *et al*, 1967) es muy simple y no explica la existencia de los compuestos detectados. Ellos indican como posible explicación la siguiente: en la pulpa de la aceituna se ha encontrado una gran cantidad de enzimas (catecolasas, cresolasas, lacasas, peroxidasas, etc.). Estos enzimas serían liberados al romper las aceitunas y entrarían en contacto con diversos polifenoles tales como o-difenoles (ácido cafeico, ácido protocatéquico, etc.), formándose el polímero. Cuando están presentes proteínas y aminoácidos los fenoles se unen a estos compuestos nitrogenados vía nucleofílica y de la unión resultan los aminofenoles.

Sin embargo también existen en el residuo otros compuestos como polisacáridos, ácidos grasos, metales, etc. Estos se agregan al polímero por reacción o absorción a la matriz durante la reacción. Este polímero está presente en alpechines frescos, esto sugiere que la reacción tiene lugar después de la liberación de compuestos en los procesos de molturación de la aceituna.

Los compuestos que acompañan en el alpechín al polímero podrían dar un gran número de procesos químicos y biológicos en las balsas. Se alterarían sus propiedades ya que se rompería y metabolizaría lugar a resíntesis de compuestos. Estos reaccionarían en el polímero haciéndolo más resistente a la degradación.

De todo lo anterior se puede deducir que el pigmento del alpechín es el típico representante de la alta recalcitrancia del residuo, como lo demuestra su elevada persistencia en todo tipo de condiciones y circunstancias. De entre sus componentes los responsables

de dicha recalcitrancia no hay que buscarlos ni en la variedad de azúcares, ácidos grasos o proteínas, sino en la matriz fenólica, originada probablemente como consecuencia de las propiedades oxidativas, espontáneas y enzimáticas de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Cheftel and Cheftel, 1980 y Sáinz Jiménez, 1986), tanto la antocianina característica del alpechín (Ragazzi *et al*, 1967), como de otros fenoles presentes (Coupy & Fleuriet, 1986; Sáinz Jiménez *et al*, 1986 y Rodríguez *et al*, 1987). Por ello estas moléculas responsables de la coloración predominante del alpechín no tienen una composición química definida.

II. DEGRADACION MICROBIANA DE COMPUESTOS FENOLICOS

Los estudios de la distribución de los compuestos aromáticos en el medio ambiente se ha venido estudiando desde 1947 (Kern, 1947). A partir de este año y con el avance de nuevas tecnologías se han ido descubriendo cientos de estos compuestos en suelos, sedimentos, extractos crudos, residuos agrícolas, etc. El papel de los microorganismos en el amntenimiento de concentraciones más o menos estables en estos ambientes está bien establecido.

Se acepta de un modo general que todos los compuestos biosintéticos están sujetos a degradación microbiana. En contraste los compuestos sintetizados por el hombre y que no guardan relación estructural con los compuestos naturales son más difícilmente metabolizados por microorganismos. La mayoría de los compuestos aromáticos no tienen origen biosintético, sino pirolítico y han estado en contacto con microorganismos durante mucho tiempo a lo largo de la evolución. No es por tanto sorprendente encontrar microorganismos capaces de degradar ciertos hidrocarburos aromáticos.

La mayoría de los estudios de degradación de hidrocarburos aromáticos se han centrado en compuestos con un solo núcleo aromático conociéndose mucho menos del metabolismo de los aromáticos policíclicos por microorganismos.

Por otro lado han sido muy estudiados los polímeros aromáticos y aunque se conocen bastante bien los procesos de degradación microbiana de monómeros aromáticos liberados de ellos, son bastante menos conocidos los procesos concernientes a su liberación por métodos biológicos. Los únicos procesos capaces de romper enlaces químicos en los polímeros son los aerobios, sin embargo, sí se han descubierto rutas anaeróbicas de degradación de monómeros aromáticos.

La fuente más abundante de núcleos benceno en el suelo es la lignina. Este es un polímero aromático, tridimensional, resistente a la hidrólisis e insoluble en agua que comprende del 20-30% del peso seco de la madera (Cain, 1981).

La segunda gran fuente de material aromático es el humus, este deriva en parte de los productos de descomposición de la lignina.

Por otro lado, muchos microorganismos, sobre todo hongos, sintetizan compuestos fenólicos a partir de precursores no aromáticos como acetato y glucosa (Cain, 1981).

Otra fuente importante de compuestos aromáticos de bajo peso molecular proviene directamente de las plantas más pequeñas en las cuales predominan éstere aromáticos y sus glucósidos.

En general, existe un equilibrio dinámico entre la incorporación al suelo de los compuestos aromáticos, tanto polímeros como compuestos de bajo peso molecular, y su degradación por microorganismos. En ocasiones, como es el caso del alpechín, se rompe este equilibrio como consecuencia de una incorporación masiva al suelo a gran concentración siendo los microorganismos incapaces de responder adecuadamente a tal acumulación.

II.1. DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS DE BAJO PESO MOLECULAR

La capacidad de las bacterias para utilizar hidrocarburos aromáticos fue demostrada ya en 1908 por Stormer (citado en Gibson & Subramanian, 1981), quien aisló un *Bacillus hexacarbarovorum* capaz de crecer con tolueno y xileno. En 1913 Söhngen demostró la utilización de benceno por microorganismos y un año más tarde Wagner aisló dos bacilos que crecían en benceno, tolueno y xileno.

En 1918, Gray y Thornton demostraron que en el suelo hay una amplia distribución de microorganismos capaces de metabolizar compuestos aromáticos. A partir de la 2ª Guerra mundial un gran número de investigadores han estudiado los aspectos bioquímicos y microbiológicos del metabolismo de estos compuestos aromáticos.

Entre los compuestos orgánicos de bajo peso molecular, por razones de relación con lo ya mencionado respecto a la composición fenólica del alpechín, conviene dividirlos en dos grandes grupos principales. Aquellos que presentan estructura C_6 (un anillo aromático no sustituido) y aquellos con estructura $C_6C_3C_6$ (dos anillos aromáticos

no sustituidos y un anillo intermedio con oxígeno), que es la básica de los compuestos del grupo flavonoide (Figura 1).

Los estudios de degradación se han realizado fundamentalmente con los de tipo C₆ y entre ellos se ha incluido tanto a hongos como a bacterias (Fukuzumi, 1981), destacando sobre todo la profusión de los estudios con bacterias, entre las que como prototipo quizá pueda hablarse de las incluidas en el género *Pseudomonas* (Fukuzumi, 1981; Kuwahara, 1981; Bayly & Barbour, 1984).

La habilidad de las bacterias para degradar monómeros con estructuras relacionadas con polímeros no parece ser un criterio importante en la degradación de estos. Sin embargo, no deben ser excluidas en la biotransformación de residuos tipo lignina. Por ejemplo, estas bacterias podrían ser usadas a la vez que otros microorganismos capaces de atacar el polímero, o bien los mismos podrían ser atacados primero por ozonolisis y los fragmentos liberados se utilizarían en la degradación microbiana.

El problema fundamental para la degradación de estos compuestos aromáticos reside en la rotura del anillo aromático, dado que poseen una gran energía de resonancia negativa, determinante de que tengan una elevada estabilidad termodinámica (Gibson & Subramanian, 1984).

La estabilidad del anillo se ve modificada por la presencia de distintos sustituyentes. Así, la susceptibilidad a la biodegradación se ve disminuida por ejemplo por la halogenación del anillo aromático, pero un mayor interés en el caso de nuestros fenoles tiene la consideración de la presencia de radicales más frecuentes como los hidroxilos.

Precisamente, la introducción de radicales hidroxilo constituye el paso previo para la rotura de anillo bencénico (Gibson & Subramanian, 1984). Una vez producida una hidroxilación doble (si no existía ya) las moléculas quedan en condiciones para poder ser degradadas (roto el anillo), según distintas rutas metabólicas presentes en los microorganismos:

- Ruta orto o intradiol o del β -ceto adipato, cuando la rotura del anillo se produce entre dos carbonos consecutivos, cada uno de los cuales soporta un grupo hidroxilo (Figura 2).

- Ruta meta, rompiéndose el enlace entre dos átomos de carbono, de los que sólo uno lleva un hidroxilo (Figura 3).

- Ruta del gentisato, que se presenta cuando los grupos hidroxilo se encuentran en posición para, como en el ácido gentísico (2,5-dihidroxibenzoico), indicada en la figura 4.

En ciertos casos es necesaria la presencia de un tercer grupo hidroxilo antes de que pueda producirse la rotura del anillo. En todos los casos se trata de degradaciones aerobias, puesto que la hidroxilación del anillo implica al oxígeno molecular. También se han citado procesos degradativos en condiciones anaerobias, pero al menos en los casos conocidos, los mecanismos moleculares son muy diferentes de los que actúan en condiciones aerobias. Así los estudios más profundos han sido realizados en condiciones aerobias, conociéndose mucho de los aspectos bioquímicos implicados (Bayly & Barbour, 1984).

La rotura del anillo aromático se ve favorecida por la presencia en el anillo de un grupo carboxilo, junto a un grupo hidroxilo libre en posición para (Kawakami, 1981). Así los compuestos como los ácidos benzoico o p-hidroxifenil acético, muestran una relativa facilidad para su degradación.

Por su parte los compuestos C₆ derivados del fenil propano (por ejemplo el ácido cafeico, figura 1) pueden entrar en dos vías generales de degradación, una en la que la rotura del anillo aromático se produce solamente tras la alteración de la cadena lateral por β - oxidación, y otra en la que tal rotura se produce sin modificación previa de la cadena lateral (Kuwahara, 1981).

Por otro lado la susceptibilidad a la degradación se ve muy afectada por la metoxilación, aunque en general las bacterias presentan una elevada capacidad para eliminar el metoxilo en posición meta.

En cuanto a los compuestos fenólicos de tipo flavonoide (figura II.2.1) su estudio de biotransformación es mucho más reducido y se conocen mucho menos las características estructurales que condicionan sus propiedades biológicas, entre ellas la susceptibilidad a la degradación.

Relacionado con la toxicidad de estos compuestos se encuentran los resultados de Spencer & Gorin (1971), los cuales encontraron que tras la contaminación del suelo con sustancias de este tipo disminuyó el

número de levaduras capaces de metabolizarlos. Este resultado contradictorio " a priori" con los principios básicos del método microbiológico, puesto que se presume que el contacto con determinado sustrato ha de facilitar el aislamiento de microorganismos capaces de metabolizarlo, es en realidad un hecho frecuente, dado que este tipo de moléculas son tóxicas en ciertas cantidades, y tal toxicidad condiciona este tipo de resultados (Evans, 1963; Lappin *et al*, 1985).

En consecuencia, el vertido de residuos ricos en compuestos fenólicos de este tipo determina la disminución de la capacidad del ecosistema receptor para degradarlos y esto es lo que se ha demostrado en el caso concreto de la contaminación de suelo con alpechín (Moreno, 1987), estableciendo una relación discreta entre su recalcitrancia y su toxicidad.

II.2. DEGRADACION DE COMPUESTOS POLIMERICOS

Como hemos indicado anteriormente no se ha hecho hasta ahora ningún tipo de estudio de degradación del pigmento polimérico del alpechín, por tanto nos hemos visto forzados a recurrir a las investigaciones de polímeros semejantes al nuestro.

El interés general de distintos grupos de investigación por microorganismos degradadores de polímeros fenólicos, debe su origen a que los tejidos lignificados de las plantas superiores constituyen la mayor fuente de energía fotosintética y materia orgánica renovable.

Sin embargo, la degradación de este tipo de materiales ha sido conducida por la evolución hacia un grupo microbiano bastante reducido, los hongos filamentosos, de modo que aunque se han citado procesos degradativos por bacterias, a estas se les asigna un papel más bien secundario en el proceso (Janshekar & Fletcher, 1982; Kirk, 1984).

Aunque la despolimerización de este polímero es un tema relativamente reciente y sus mecanismos son prácticamente desconocidos, se ha descubierto que en la degradación de la lignina por hongos se libera al medio de cultivo los siguientes compuestos aromáticos (citado en Kuwahara, 1981): ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido sirínico,

ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxicinámico, ácido 3-metoxi-4 hidroxifenil pirúvico, vanillina, coniferil aldehído, siringaldehído, p-hidroxicinamalaldehído, guaiacil glicerol, β -coniferil éter y otros.

Sin embargo en la biotransformación de este polímero por bacterias, concretamente por *Pseudomonas ovalis*, no se produjo acumulación de intermedios de bajo peso molecular en el medio de cultivo, lo cual sugiere una sucesiva ruptura de la lignina desde los terminales más que de una extensa despolimerización (Janshekar *et al.*, 1981; Kawakami, 1981).

Los microorganismos del suelo, tanto bacterias, levaduras como los hongos, son capaces de asimilar los posibles compuestos que se irán liberando en la despolimerización, por tanto todos los microorganismos intervienen en la descomposición de la lignina aunque en distintas etapas (Kawahara, 1981).

II.2.1. DEGRADACION DE POLIMEROS POR BACTERIAS

Existen muchos géneros de actinomicetos (*Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Micromonospora*) y eubacterias (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*) que son capaces de degradar varios tipos de ligninas. Sin embargo, son pocos los trabajos existentes a este respecto y actualmente se hallan restringidos a actinomicetos y Mixobacterias (Buswell & Odier, 1987).

En general provocan una disminución del contenido en grupos metoxilo y la reducción del tamaño molecular.

II.2.2. DEGRADACION DE POLIMEROS POR HONGOS

En la naturaleza se encuentran tres tipos principales de hongos sobre madera en descomposición: hongos de la podredumbre blanda, podredumbre blanca y podredumbre parda. Los mejores conocimientos derivan de los dos últimos tipos, puesto que los primeros aunque tienen capacidad para degradar la lignina no se sabe si el ataque está restringido a ciertas subestructuras del polímero.

II.3. DECOLORACION DE RESIDUOS FENOLICOS

El alpechín, como ya hemos indicado anteriormente es un líquido de color más o menos negruzco dependiendo del sistema de extracción y la accesibilidad del oxígeno a las balsas. Este color es debido principalmente a la presencia de una molécula polimérica de naturaleza fenólica que posee una alta reactividad.

Tomo Díaz *et al* (1979) hicieron los primeros intentos de decoloración del alpechín por acción de distintos tipos de suelo. En estos experimentos no fue posible asignar a los microorganismos aislados papel alguno en la decoloración del residuo.

El efecto decolorante que el suelo ejerce sobre el alpechín es debido a dos causas: a procesos físico-químicos de adsorción y/o absorción de las moléculas pigmentadas y a procesos microbiológicos, siendo mayor la decoloración en alpechín diluido (Moreno, 1987).

En un "screening" realizado por Sáinz Jiménez y Gómez Alarcón (1986) sobre la capacidad de decoloración del alpechín en medios sólidos por 19 hongos (9 *Penicillium*, 2 ascomicetos y 8 basidiomicetos). Sólo inhibió el crecimiento de *Chaetomium elatum* e *Inonotus hispidus*, sin embargo sólo los basidiomicetos fueron capaces de decolorar el residuo después de 5 a 17 días de incubación.

El más rápido es *Phanerochaete chrysosporium* que inicia la decoloración a los 15 días de incubación a 39°C, 6 días a 30°C y 9 días a 25°C. Estos autores asignan esta decoloración a la capacidad del hongo de degradar compuestos aromáticos y a la acción de fenol oxidasas y ligninasas producidas en el metabolismo secundario.

Por otro lado frecuentemente se ha intentado la decoloración de distintos tipos de residuos fenólicos por hongos. Así Tono *et al* en 1968 demostraron que un hongo del género *Aspergillus* clarificaba un medio que contenía un derivado de la lignina. Un año más tarde Marton *et al* mostraron la decoloración de residuos lignocelulósicos líquidos por *Polyporus versicolor* debido principalmente a la adsorción por el micelio. Fukuzumi en 1981 ensayó 25 especies de hongos tropicales de los cuales eligió 10 cepas. Cinco de estas pasan el color negro de los residuos a amarillento, provocando la mayor decoloración *Tinctoporia*

a) Degradación por hongos de la podredumbre parda: la lignina se degrada ligeramente quedando la residual poco despolimerizada. Esta es deficiente en grupos metoxilo, está enriquecida en oxígeno y ha sufrido modificaciones en muchos grupos funcionales. Se produce demetilación de grupos aril-metoxilo e hidroxilación de anillos aromáticos (citado en Kirk, 1984).

b) Degradación por hongos de la podredumbre blanca; son los mejor estudiados por su gran capacidad ligninolítica, siendo capaces de promover la despolimerización y el consumo de los anillos aromáticos liberados. Puede ser que tengan el mismo sistema de degradación que los hongos anteriores, pero los de la podredumbre parda tendrían bloqueadas ciertas reacciones, de modo que no podrían descomponer totalmente el polímero.

A pesar de la reducción en el contenido en grupos metoxilo, no aparecen las unidades metoxi-deficientes tan características de la degradación por hongos de la podredumbre parda.

La degradación de la lignina se produce tanto en las cadenas laterales, originando grupos α -carboxilo y α -carbonilo, como en los anillos aromáticos.

Como consecuencia de lo anterior se produce:

-Liberación de restos alifáticos.

-Liberación de restos aromáticos (vanillina y ácido vanílico entre otros), tanto ácidos como neutros, tanto de bajo Pm como oligoméricos.

-Liberación de restos aromáticos unidos a cadenas alifáticas, detectados en cantidades traza.

Según Kirk (1987) la degradación no se produce a través de una ruta secuencial, sino a través de muchos intermediarios incluidos en diferentes rutas.

El hongo de la podredumbre blanca más estudiado por su capacidad de degradar la lignina hasta el momento es sin duda *Phanerochaete chrysosporium*.

II.2.2.1. Degradación por *Phanerochaete chrysosporium*

Actualmente se sabe que el sistema de degradación de este hongo es una expresión del metabolismo secundario, aunque esto no se puede extrapolar a los actinomicetos u otros hongos.

Para degradar la lignina necesita la presencia en el medio de cultivo de algún sustrato carbonado, como por ejemplo celulosa, glucosa, etc. que proporciona la energía necesaria para la despolimerización. Por otra parte, la actividad ligninolítica es máxima a un 100% de concentración de oxígeno, es decir es un proceso altamente oxidativo. También la limitación en nitrógeno dispara la síntesis del sistema degradativo y éste es reprimido por la presencia del ión amonio y de aminoácidos. Sin embargo, Buswel *et al* (1984) demostraron que pueden obtenerse máximas actividades lignolíticas en condiciones de suficiencia en nitrógeno. Por otro lado se ha demostrado que se origina más degradación en reposo que en agitación ya que en estas últimas condiciones se forman "pellets" que poseen en su interior una baja concentración de oxígeno.

Los enzimas implicados en estos procesos son los siguientes: ligninasas, peroxidasas, fenol oxidasas y enzimas productores de agua oxigenada (Gold *et al*, 1983; Kirk *et al*, 1983; Kuwahara, 1984; Kirk *et al*, 1987; Ulmer & Odier, 1987).

borbónica, observándose éste a partir del cuarto día de incubación y en presencia de etanol como sustrato carbonado. En todos los casos es necesaria la presencia de oxígeno. Los análisis elementales hechos a los sobrenadantes revelan que el contenido de carbono y grupos hidroxilo fenólicos había disminuido respecto a su control.

Las ligninas degradadas en presencia de etanol tienen un peso molecular más bajo que las originales y los compuestos aromáticos de bajo Pm desaparecen totalmente. En ausencia de etanol aumenta el peso molecular. Con estos resultados se demostró que para la decoloración de residuos ricos en ligninas es necesaria la presencia de un cosustrato como la glucosa o el etanol. El requerimiento de una fuente de carbono adicional puede ser debido a la necesidad de energía como ATP, NAD, NADP y agentes reductores como NADH o NADPH y otros transportadores de electrones producidos en el metabolismo de la glucosa o etanol.

Kirk y Tien en 1986 obtuvieron por irradiación con UV el mutante *Phanerochaete chrysosporium* SC 26 que produce una cantidad muy alta de ligninasa y que se caracteriza por producir grandes zonas de decoloración en un medio sólido que contenía derivados de color de la lignina.

Muchos autores (Ulmer *et al.*, 1984) opinan que es el mismo sistema el que está implicado tanto en la degradación como en la decoloración del polímero, por lo que se ha postulado el uso de la decoloración como un método rápido de "screening" para seleccionar microorganismos que degradan ligninas.

OBJETO DEL TRABAJO

De todo lo expuesto se deduce que de los componentes del alpechín, los que presentan un mayor interés desde el punto de vista microbiológico para mejorar las expectativas de eliminación y/o aprovechamiento de estos residuos, son sus compuestos aromáticos. Dada la inexistencia de estudios previos relacionados con este tema, el campo de estudio, es "a priori" forzosamente amplio.

Ante la imposibilidad de abordar un estudio exhaustivo, procedimos a centrar nuestro objeto de estudio en dos grandes grupos de compuestos fenólicos del residuo; los de bajo peso molecular y los de tipo polimérico. Como representantes del primer grupo se eligieron los ácidos fenólicos característicos del residuo según Balice y Cera (1984), y como representante del segundo el pigmento del alpechín.

Ante la posibilidad de realizar el estudio con microorganismos de colección o con aquellos otros aislados de ambientes relacionados con el alpechín, elegimos esta segunda opción, dadas las especiales características del residuo. Sin embargo también se ha ensayado el efecto de un microorganismo de colección (*Phanerochaete chrysosporium* SC-26) sobre el pigmento polimérico del alpechín.

Puesto que uno de los componentes más recalcitrantes del residuo es su pigmento, este fue elegido como sustrato para la realización de los cultivos de enriquecimiento de los que se han obtenido microorganismos recogidos en la presente memoria.

Como resumen, el plan de trabajo seguido ha sido el siguiente:

1. Obtención y caracterización del pigmento del alpechín.
2. Selección de microorganismos utilizando dicho pigmento como sustrato.
3. Caracterización de tales microorganismos.
4. Transformación de compuestos fenólicos del alpechín por estos microorganismos.

MATERIAL Y METODOS

I. EXTRACCION Y PURIFICACION DEL PIGMENTO

El alpechín fué recogido de la Cooperativa "San Francisco" de Huétor Tájar (Granada), donde existe un sistema de extracción "Alfa-Laval" para la obtención de aceite de oliva. Las muestras se tomaron directamente de la salida de las centrifugas. Se recogieron en frascos estériles y se filtraron en el laboratorio por papel jarabe. Se esterilizaron a 121° C durante 20 minutos. Se conservaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

La extracción y purificación del pigmento se realizó según la técnica descrita por Ragazzi *et al* (1967), con ligeras modificaciones.

I.1. EXTRACCION

Se concentran 2500 ml de alpechín con un rotavapor a 40°C hasta un volumen final de 500 ml. El concentrado se dispuso en un vaso de precipitados de 5000 ml de capacidad que contenía 2000 ml de acetona y tras agitar vigorosamente se dejó precipitar a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se recogió el precipitado viscoso de color marrón negruzco. Se solubilizó en 250 ml de agua destilada y sobre esta solución se vertieron poco a poco y agitando 2500 ml de acetona.

Se dejó de nuevo precipitar durante 24 horas a 4°C. Apareció un precipitado marrón oscuro y grumoso, que se recogió en 275 ml de agua destilada. Esta suspensión se dispuso en un vaso de precipitados de 5000 ml de capacidad que contenía 2000 ml de metanol. Tras agitar vigorosamente se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 72 horas. El precipitado formado se recogió por filtración con ayuda de una espátula y se lavó 3 veces con metanol. Finalmente se desecó al vacío.

I.2. PURIFICACION

Se pesaron 63,6 g de pigmento extraído según la técnica descrita anteriormente y se disolvieron en 2544 ml de agua destilada, calentando al baño maría para facilitar la disolución. Una vez fría, se filtró por papel jarabe y al filtrado se le añadieron muy lentamente y agitando 318 ml de bromuro de cetil-trimetil amonio al 5%. La

suspensión formada se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 20 minutos. El precipitado se lavó 3 veces con bromuro de cetil-trimetil amonio al 0,1% y se disolvió en 1,908 ml de metanol. Tras centrifugación, se recogió el sobrenadante y se le añadieron 63,3 ml de NaCl 2M. Se volvió a centrifugar a 5000 r.p.m. durante 20 minutos y el precipitado se lavó con metanol-NaCl 2M (100:1) y finalmente se lavó con éter.

Con objeto de eliminar posibles restos de disolventes orgánicos, el precipitado final se disolvió en 300 ml de agua destilada y se desecó en rotavapor a 4°C. Se disolvió de nuevo en agua destilada y esta solución sometió a diálisis en agua destilada a 42 C durante 48 horas. El dializado se conservó congelado a -20°C.

Se ensayó el efecto antibacteriano de este pigmento purificado. Para ello el pigmento se concentra 16,7 veces respecto a su concentración en el alpechín (Gonzalez, 1986).

Se utiliza en esta experiencia la técnica descrita por Rodríguez *et al* (1987). Se ensaya este poder inhibidor frente a *Bacillus megaterium* ATCC 33085.

Se pudo comprobar que el pigmento purificado tenía un marcado efecto antibacteriano, mientras que el no purificado carecía de dicho efecto. Fácilmente se deduce que este efecto es debido a restos de bromuro de cetil-trimetil amonio, que posee un gran poder antimicrobiano. Fue necesario por tanto añadir un nuevo paso en el esquema de purificación, consistente en una nueva precipitación con acetona, obteniéndose un precipitado desprovisto de actividad inhibidora del crecimiento frente a *Bacillus megaterium* ATCC 33085. Este precipitado se redisolvió en agua destilada y se conservó a -20°C.

A partir de 20 l de alpechín se obtuvieron 600 ml de una solución de pigmento de 3,13 % (p/v), lo que representa una concentración de 0,0939 % del pigmento del alpechín.

II. ANALISIS DEL PIGMENTO

II.1. OXIDACION CON OXIDO DE COBRE

En un matraz de fondo redondo recubierto por una manta de amianto se dispusieron 2 ml de la solución de pigmento, 650 mg de sal

de Mohr ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), 3650 mg de CuO y 187 ml de NaOH 2 N. Se calentó a 200°C durante dos horas en atmósfera de nitrógeno, controlando la temperatura con un termómetro acoplado al matraz. Transcurrido este tiempo se enfrió rápidamente en un chorro de agua y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 25 minutos. El precipitado se lavó con agua y se reunieron los sobrenadantes. Estos se acidificaron con HCl 6N y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora, tras la cual se volvió a centrifugar y el precipitado se lavó con HCl al 0,1%. Los sobrenadantes se concentraron en un rotavapor con objeto de facilitar la posterior extracción de fenoles.

II.2. EXTRACCION DE FENOLES

Las muestras se acidificaron con HCl y se realizaron tres extracciones sucesivas con éter etílico (v/v) agitando durante dos minutos cada vez.

Se reunieron las fases orgánicas y se concentraron a sequedad en un rotavapor a 40°C . Los fenoles se redisolviéron en 1 ml de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1).

II.3. CARACTERIZACION DE FENOLES

II.3.1. Por Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

Se siguió la metodología descrita por Olano y Hernández (1985). Para realizar los análisis se utilizó un equipo de CLAE formado por los siguientes elementos:

Dos bombas 6000 A, Waters Associates.

Módulo de compresión radial RCM 100, Waters Associates.

Columna C 18 de 100/8 mm y de $5 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula.

Detector 440 nm con filtros de 280 nm y 340 nm, Waters Associates.

Programador 730, Waters Associates.

Registrador OMNISCRIBE de doble pluma Houston Instrument.

La detección se hizo a 280 nm y 340 nm sobre los eluatos obtenidos según la tabla 2. Los fenoles se identificaron por su tiempo de retención y por el cociente entre los factores de respuesta a 280 nm y 340 nm.

II.3.2. Por cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizó según la técnica descrita por Gómez-Cordovés *et al* (1978), sobre placas de celulosa MN 300 G de 25 por 25 cm.

Los eluyentes utilizados fueron los siguientes:

- a) Acido fórmico al 2% como primer eluyente.
- b) Isopropanol/Amoniaco/Agua (8:1:1) como segundo eluyente.

Como reveladores se emplearon:

a) Acetato básico de plomo II al 25%. Tras la pulverización y secado de las placas, éstas se observaron a 350 nm y 254 nm para la detección de aldehidos, cetonas y ácidos cumáricos.

b) Acetato sódico anhidro-p-nitroanilina diazotada. Para la preparación de este reactivo, que ha de ser extemporáneo, se mezclaron acetato sódico anhidro (20%) y p-nitroanilina (0,5%) en la proporción 8:2. Se añadieron unas gotas de nitrito sódico (5%) y se dejó diazotar (aparición de un precipitado amarillo). Tras la pulverización y secado de las placas fueron tratadas con una solución de carbonato sódico (15%), detectándose la presencia de ácidos y alcoholes a simple vista.

Para el revelado de catequinas se pulverizaron las placas con otros reveladores: cloruro férrico (5%) y una vez secas se tratan con ferrocianuro al 1%.

II.4. FILTRACION POR "SEPHADEX" G-100

El gel se preparó siguiendo las recomendaciones de la casa administradora, disponiéndose en una columna 1 por 60 cm y se equilibró con NaCl 1M.

Las respectivas muestras (0,5 ml) se eluyeron en la misma solución a un flujo de 15 ml/hora, recogiendo fracciones de 2,5 ml

Tabla 2. Gradiente utilizado en la elución de fenoles.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	A(%)	B(%)	curva
-	1,0	100	100	5
3	1,0	100	0	5
5	1,0	50	50	5
10	1,1	40	60	5
20	1,2	30	70	5
22	1,2	25	75	5
25	1,2	20	80	5
30	1,2	15	85	5
50	1,1	15	85	5
55	1,0	100	0	5

A: Acético-Agua (90:2)

B: Agua-Acético (68:2:30)



sobre un colector de fracciones. La absorción fue determinada utilizando un detector UVICORD a 280 nm.

II.5. ESPECTROFOTOMETRIA

Para la realización de los espectros en el visible y ultravioleta se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 5, en el que se aplicaron las muestras disueltas en agua a pH 7.

El espectro de infrarrojos se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer IR-782. Para ello se mezcló 1 mg de pigmento con la cantidad suficiente de bromuro potásico para la obtención de la pastilla correspondiente.

III. MEDIOS DE CULTIVO

III.1. MEDIO MINIMO

Se utilizó el medio mínimo descrito por Sparrins *et al* (1984), con alguna modificación, resultando la siguiente composición:

Fosfato bisódico	0,866 g
Fosfato monopotásico	0,530 g
Cloruro amónico	2,000 g
Solución madre de sales	4,000 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	6,0

Solución madre de sales (Rosenberger y Elsen, 1960)

HCl	50 ml
MgO	10,000 g
CaCO ₃	2,000 g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	5,600 g
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	1,440 g
MnSO ₄ .4 H ₂ O	1,110 g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,250 g
CoSO ₄ .5 H ₂ O	0,280 g
H ₃ BO ₃	0,062 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Se añadió el HCl a 200 ml de agua destilada y se disolvió el MgO y el CaCO₃, en este orden, calentando cuando fue preciso. Se disolvieron después el resto de las sales.

La solución madre y los fosfatos se esterilizaron por separado, mezclándose una vez fríos, en condiciones estériles.

III.2. AGAR DE SOJA TRIPTICASEINA (TSA)

Este medio de cultivo se utilizó para comprobar la pureza de las cepas. Su composición es la que sigue:

Peptona de caseína	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	7,3

Se esterilizó a 121° C durante 20 minutos y se repartió en placas Petri.

III.3. AGAR DE SABOURAUD GLUCOSADO

Se utilizó para el aislamiento de hongos. Su composición es:

Glucosa	40 g
Peptona de caseína	5 g
Peptona de carne	5 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	7,3

Se esterilizó a 121° C durante 20 minutos y se repartió en placas Petri.

III.4. CALDO DE SOJA TRIPTICASEINA (TSB)

En este medio se realizaron los inóculos de las bacterias, Está compuesto por:

Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Fosfato monopotásico	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	7,3

Se repartió en tubos de ensayo (5 ml/tubo) y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

III.5. AGAR-EXTRACTO DE MALTA

Este medio de cultivo se utilizó para el aislamiento, crecimiento, observación de las características morfológicas y conservación de hongos. Está compuesto por:

Extracto de malta	13,0 g
Dextrina	2,5 g
Peptona de gelatina	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	5,5

Se esterilizó a 121°C durante 20 minutos y se repartió en placas Petri y en tubos de tapón de rosca.

III.6. AGAR CZAPEK (Raper y Thom, 1949)

Se utilizó este medio para la caracterización del hongo como una cepa del género *Aspergillus*.

Su composición es la que sigue:

Glucosa	30,0 g
Fosfato bipotásico	1,0 g
Sulfato magnésico pentahidratado	0,5 g
Cloruro potásico	0,5 g
Sulfato férrico pentahidratado	0,01 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
pH final	6,8

Se esterilizó a 121°C durante 20 minutos y se repartió en placas Petri.

III.7. MEDIO BIII MODIFICADO (Kirk, 1978)

Este medio de cultivo se utilizó para el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* SC-26. Tiene la siguiente composición:

Glucosa	10,080 g
Tiamina	0,005 g
Fosfato monopotásico	0,200 g
Sulfato magnésico pentahidratado	0,050 g
Cloruro cálcico	0,010 g
Solución de sales*	1,000 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

*Es la solución de sales descrita en el apartado III.1 de este capítulo.

Se esterilizó por separado la solución de sales y el resto de los componentes. Se mezclan en frío en condiciones estériles.

IV. CULTIVOS DE ENRIQUECIMIENTO

IV.1 PROTOCOLO INICIAL

IV.1.1. Preparación de inóculos

Los inóculos se realizaron a partir de tres fuentes distintas:

- a) Suelo de la balsa de evaporación de alpechín de la Cooperativa "San Francisco" de Huétor a Tájar (Granada) (Cultivos TB).
- b) Alpechín desecado tomado de la misma balsa de evaporación (Cultivos AL).
- c) Aceitunas en descomposición (Cultivos AC).

Los tres tipos de muestra se maceraron al 20% en agua destilada estéril a 28°C en agitación durante una noche. Transcurrido este tiempo se filtraron y los cultivos se utilizaron como inóculo.

IV.1.2. Cultivos

A nueve matraces Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad se adicionaron 175 ml de medio de cultivo de Sparrins et al (1984) modificado (apartado III.1 de este capítulo) y concentrado dos veces. A cada matraz se le añadieron 10,5 ml de la solución madre de pigmento al 3,13 %.

A tres de estos matraces se les añadió extracto de levadura (1g/l) y casaminoácidos (1g/l), nominándose con el prefijo R.

Los nueve matraces se inoculan con 175 ml de la respectiva suspensión indicada en el apartado anterior. Uno de cada tipo se vuelve a esterilizar a 121°C durante 20 minutos tres veces sucesivas a intervalos de un día. Estos últimos fueron utilizados como controles de decoloración y se nominaron con el sufijo E.

IV.1.3. Resiembras y aislamientos

Cada 15 días se realizan tres resiembras sucesivas a los 15, 30, 60 y 90 días de incubación a 28°C sobre el mismo medio de cultivo adicionado de pigmento (0,009%, p/v).

De la última se procedió al aislamiento de los microorganismos sobre el mismo medio de cultivo adicionado de agar.

El protocolo inicial seguido en los cultivos de enriquecimiento se esquematiza en la figura 5.

IV.2. MODIFICACION DEL PROTOCOLO INICIAL Y AISLAMIENTO DEL HONGO DECOLORADOR

Dado que no se detectó decoloración de los cultivos de enriquecimiento, sino que ésta solamente se produjo en algunas de las resiembras de un modo aparentemente aleatorio y en todos los casos tras periodos de incubación superiores a 15 días, se modificó el protocolo inicial, reorientándolo hacia el aislamiento de los microorganismos presentes en los cultivos decolorados.

Tales aislamientos se realizaron inicialmente en las mismas condiciones que el protocolo inicial. Sin embargo, como se indica en el apartado correspondiente de resultados fue necesaria la modificación del medio de cultivo para conseguir aislar un microorganismo que modificase la coloración de dicho medio. A este se le añadió una fuente de carbono alternativa y se modificó la relación C/N tal y como indican otros autores para aislamiento de microorganismos degradadores de polímeros fenólicos.

En estos experimentos se utilizaron seis tipos de medio:

1) Medio mínimo con pigmento: es el medio utilizado para realizar las resiembras de los cultivos de enriquecimiento (apartado 4.1.2 de este capítulo).

2) Medio limitado en nitrógeno (medio N): es el medio mínimo con pigmento con una concentración diez veces inferior en cloruro amónico (0,2 g/l).

3) Medio con glucosa (medio G); es el medio mínimo con pigmento adicionado con 20 g/l de glucosa.

4) Medio con etanol (medio Et); es el medio mínimo con pigmento adicionado con 2 ml/l de etanol. Este sustrato se añadió esterilizándolo por filtración.

5) Medio con glucosa limitado en nitrógeno (medio NG); es el medio limitado en nitrógeno añadido con 20 g/l de glucosa.

6) Medio con etanol limitado en nitrógeno (medio NEt); es el medio limitado en nitrógeno añadido con 20 ml/l de etanol.

Para el aislamiento del hongo se utilizaron tres medios de cultivo: Sabouraud glucosado, agar-malta y TSA.

V. CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS AISLADAS

A todas las cepas aisladas se les realizó tinción de Gram, tinción de esporas (a las Gram +) y movilidad, así como las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa y "test" de óxido fermentación. Con los resultados obtenidos se incluyeron en distintos grupos taxonómicos siguiendo los criterios de Ramos Cormenzana (1979); Krieg y Holt (1984) y Sneath et al (1986).

V.1. PRUEBAS MORFOLOGICAS

La morfología, movilidad y tinción de Gram se observaron en cultivos de 24 horas y la tinción de esporas (en su caso) en cultivos de 7 días.

V.1.1. Movilidad

Se sembraron los microorganismos en TSA y se incubaron a 28°C durante 48 horas. De estos cultivos se preparó una suspensión que fue observada entre porta y cubre empleando el objetivo fuerte seco e iluminación reducida para la determinación microscópica de la movilidad.

V.1.2. Tinción de Gram

Las bacterias se fijaron primero con calor y luego se tificaron con cristal violeta. A continuación, para fijar el colorante se trató con una mezcla de I₂-IK, después se lavaron con alcohol y finalmente se les aplicó safranina, como colorante de contraste (Hucker & Conn, 1923).

V.1.3. Tinción de esporas

Sólo se realizó para los bacilos Gram +. Se sembraron los microorganismos en el medio descrito por Norris *et al* (1981), para así prevenir la posible ausencia de esporulación por deficiencia de manganeso. La presencia de esporas se puso de manifiesto siguiendo el método propuesto por Schaeffer y Fulton (1933).

V.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS

Las pruebas bioquímicas se determinaron a partir de un cultivo de 48 horas en TSA.

V.2.1. Catalasa

Este enzima se determinó mediante la adición directa de un poco de masa de un cultivo joven, obtenido en TSA, a una gota de H₂O₂ de 10 volúmenes. El desprendimiento de burbujas de oxígeno hace que la prueba se considere positiva.

V.2.2. Oxidasa

Se determinó haciendo una extensión de un cultivo joven, sobre un papel de filtro y colocando encima una gota de reactivo de oxidasa (solución acuosa de tetrametil-parafenilendiamina al 1%) preparado extemporáneamente. La aparición de un color púrpura intenso en los 10 primeros segundos, hace que la prueba sea considerada positiva (Kovacs, 1956).

V.2.3. Prueba de óxido-fermentación sobre la glucosa o de Hugh-Leifson

El microorganismo se sembró en picadura con un hilo de platino en dos tubos de este medio, regenerados previamente (ebullición y enfriamiento rápido) y a uno de ellos se le añadió parafina estéril. Se llevaron a incubar a 28°C y se hicieron las lecturas durante 15 días (Hugh & Leifson, 1953). Se utilizan como control tubos de medio basal sin glucosa.

VI. CARACTERIZACION DEL HONGO

VI.1. OBSERVACION MICROSCOPICA

La identificación del hongo se realizó por pruebas morfológicas exclusivamente.

El primer paso fue la observación microscópica. Para una mejor visualización se hicieron tinciones específicas para hongos en el colorante azul-algodón. Así mismo se observó por microscopía

VI.2. OBSERVACION MACROSCOPICA

Se encuadró el hongo dentro del género *Aspergillus* por su morfología, por lo que se cultivó en un medio específico para *Aspergillus* y *Penicillium*, el medio de Czapek (III,6 de este capítulo). Además se cultivó en agar-malta (apartado III,5). En ambos medios se determinó el tamaño, textura y coloración de las colonias. Así mismo, en cultivos viejos se observó la morfología de las cabezas conidiales con ayuda de una lupa.

VII. TRANSFORMACION DE COMPUESTOS AROMATICOS DEL ALPECHIN

VII.1. DE BAJO PESO MOLECULAR

VII.1.1. Inóculos y ensayo de degradación

Para ensayar la capacidad de degradación de los ácidos fenólicos por las bacterias, estas se cultivaron previamente en TSB (5ml/tubo) en agitación a 28°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se inoculan estas bacterias al 10% por triplicado en el medio mínimo de Sparrins *et al* (1984) descrito en el apartado III,1, adicionado de una mezcla de los ácidos fenólicos descritos en el alpechín por Balice y Cera (1984). Se incuban en agitación a 28°C durante 72 horas.

VII.1.1.1. Medio para ensayos de degradación de ácidos fenólicos

El medio base es el de Sparrins et al. (1984). A 500 ml de este se adicionan 1,35 ml de la siguiente solución:

ácido p-hidroxifenil acético	0,130 g
ácido vanillico	0,140 g
ácido cafeico	0,150 g
ácido siríngico	0,170 g
ácido verátrico	0,150 g
dimetil formamida c.s.p.	2,700 ml

Este medio se repartió en tubos de ensayo a razón de 4,5 ml por tubo.

VII.1.2. Extracción de ácidos fenólicos

Después de ensayar varias técnicas de extracción descritas en la bibliografía se pudo comprobar el mayor rendimiento del método descrito por Andreoni y Bestetti (1986).

Los cultivos incubados en las condiciones indicadas en V.1.1. durante 72 horas se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 15 minutos, para separar las células.

A 4 ml del sobrenadante se les añadió 200 μ l de una solución madre de 2000 μ l de ácido protocatéquico que fue utilizado como patrón interno en la cuantificación por CLAE. Dicho ácido por tanto estará en el sobrenadante a una concentración de 100 μ g/ml. Seguidamente se llevó el pH a 1-2 con HCl 20% y se saturó con NaCl. Los sobrenadantes se extrajeron 5 veces (agitando 2 minutos cada vez) con acetato de etilo (v/v). Las fases orgánicas se reunieron y se desecaron con sulfato anhidro durante 75 minutos. Se desecaron a vacío y se redisolviéron en 2ml de dimetil formamida.

Las muestras así obtenidas se filtraron por 0,45 μ m y se conservaron congeladas hasta el momento de su análisis por CLAE.

VII.1.3. Análisis por CLAE de los ácidos fenólicos residuales

Estos análisis fueron realizados en un equipo de CLAE compuesto por los siguientes módulos:

Dos bombas 501 WATERS ASSOCIATES

Columna C-18 de fase reversa de 5 μ m de tamaño de partícula

Detector LC 75 PERKIN ELMER

Programador WATERS MILLIPORE GRADIENT CONTROLLER

Registrador LCI 100 PERKIN ELMER

Las condiciones de elución utilizadas fueron las descritas por Roston y Kissiger (1981):

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	A(%)	B(%)	Curva
0	2,5	10	90	-
8	2,5	70	30	6
10	2,5	10	90	6

A: Agua-Acido acético-Acetonitrilo (5:45:50)

B: Acido acético-Agua (3:97)

VII.2. DEL PIGMENTO

VII.2.1. En cultivos de enriquecimiento

La decoloración solamente se observó en algunos cultivos del protocolo inicial de aislamiento tras largos periodos de incubación.

Los fenoles libres de estos cultivos y sus respectivos controles se extrajeron según se indica en el apartado II.2 de este capítulo y se analizaron por CLAE (II.3.1) y por cromatografía en capa fina (II.3.2). Alguno de los cultivos fueron sometidos a oxidación con óxido de cobre (II.1).

VII.2.2. Por *Phanerochaete chrysosporium* SC-26

Este microorganismo fue cedido por el Dr. T. K. KIRK del Usda Forest Products Laboratory en Madison (USA).

El hongo se inoculó en 5 ml del medio de cultivo descrito por Kirk *et al* (1978) y modificado por nosotros. Estos 5 ml se inocularon en frascos Roux dispuestos con 120 ml del mismo medio de cultivo adicionado de 0,36 ml de solución de pigmento (3,13% p/v). Se incubaron a 40°C durante 35 días. Estos cultivos una vez filtrados se sometieron a análisis por CLAE (2.3.1) y por cromatografía en capa fina (II.3.2).

VII.2.3. Por *Aspergillus terreus* Thom

VII.2.3.1. Cinética de crecimiento

Para poder estandarizar los inóculos de los estudios posteriores fue necesario obtener una suspensión de esporas. Para ello se sembraron varios tubos de agar-extracto de malta, incubándose durante 15 días. Las esporas de estos cultivos se recogieron en solución salina. El número de esporas viables por mililitro ($2,5 \times 10^7$) se determinó por la técnica descrita por Miles y Mishra (1938), haciéndose diluciones en solución salina 0,9% y sembrando en agar-extracto de malta. Las placas se incubaron durante 72 horas a 28°C y se contaron las colonias con ayuda de una lupa.

La cinética de crecimiento se determinó tanto en el medio modificado de Sparrins *et al* (1984) con 20 g/l de glucosa, como en éste mismo medio con 3 ml/l de solución de pigmento.

Para ello se repartieron se repartieron 50 ml de ambos medios de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad. Se inocularon (al 1%) con la suspensión de esporas y se incubaron durante 10 días,

determinándose por triplicado el peso seco de la masa miceliar recogida por filtración, mantenida a 105°C durante 24 horas.

VII.2.3.2. Modificación de la absorbancia

La absorbancia de los filtrados fue medida en un espectrofotómetro KONTRON UVIKON 810.

VII.2.3.3. Modificación del pH

Para la determinación de este parámetro en los filtrados se utilizó un pHmetro pH M 62 Standard Radiometer Copenhagen, con electrodo de vidrio.

VII.2.3.4. Consumo de glucosa

Se midió el consumo de glucosa por *Aspergillus terreus* Thom en los cultivos con y sin pigmento. Para esta determinación se utilizó un glucosímetro BECHMAN Glucose Analyzer 2.

VII.2.3.5. Cromatografía de gases y espectrofotometría de masas

Para estos análisis se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Pakard 5890 dotado de una columna capilar de metilsilicona de 12 metros de longitud y 0,2 mm de diámetro interno acoplado a un espectrofotómetro de masas MS System Hewlett-Pakard 5988 A.

En la cromatografía de gases se siguieron las siguientes condiciones:

Inyector 250°C, línea de transferencia 280°C, fuente de iones 200°C. El gas portador fue el helio. Se hizo un gradiente de 10°C desde 80°C de temperatura inicial a 300°C de temperatura final.

VII.2.3.6. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

El cromatografo utilizado y las condiciones de elución fueron las descritas en el apartado II,3,1, de este capítulo.

VII,2,3.7. Filtración por "SEPHADEX" G-100

Las muestras se eluyeron en la columna y condiciones descritas en el apartado II,4 de este capítulo.

RESULTADOS

I. ANALISIS DEL PIGMENTO MACROMOLECULAR DEL ALPECHIN

Antes de utilizar el pigmento extraído del alpechín tanto en los cultivos de enriquecimiento como en los ensayos de decoloración se sometió análisis encaminados sobre todo a un mejor conocimiento de los compuestos aromáticos que componen el polímero.

La información bibliográfica sobre el contenido fenólico del polímero nos parecía insuficiente. Por ello sometimos las preparaciones de pigmento a análisis de fenoles libres y polimerizados. Para estos últimos fue necesario romper la macromolécula mediante una oxidación fuerte con óxido de cobre.

I.1. POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (CLAE) Y POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

I.1.1. COMPUESTOS AROMATICOS LIBRES

Las preparaciones de pigmento carecen de cantidades significativas de fenoles de bajo peso molecular, como se deduce del cromatograma obtenido por CLAE (Figura 6) cuando se utilizaron los extractos etéreos del polímero no sometido a ningún tratamiento.

En la placa de cromatografía en capa fina correspondiente no se observaron manchas al ultravioleta. Tras el revelado con acetato de plomo II básico al 25% aparecieron dos manchas ténues (resultados no mostrados) que parecen corresponder a la p-vanillina y siringaldehído. Estos compuestos deben de estar a concentraciones muy pequeñas ya que para observar estas dos manchas fue necesario utilizar una cantidad de muestra mayor de la usual.

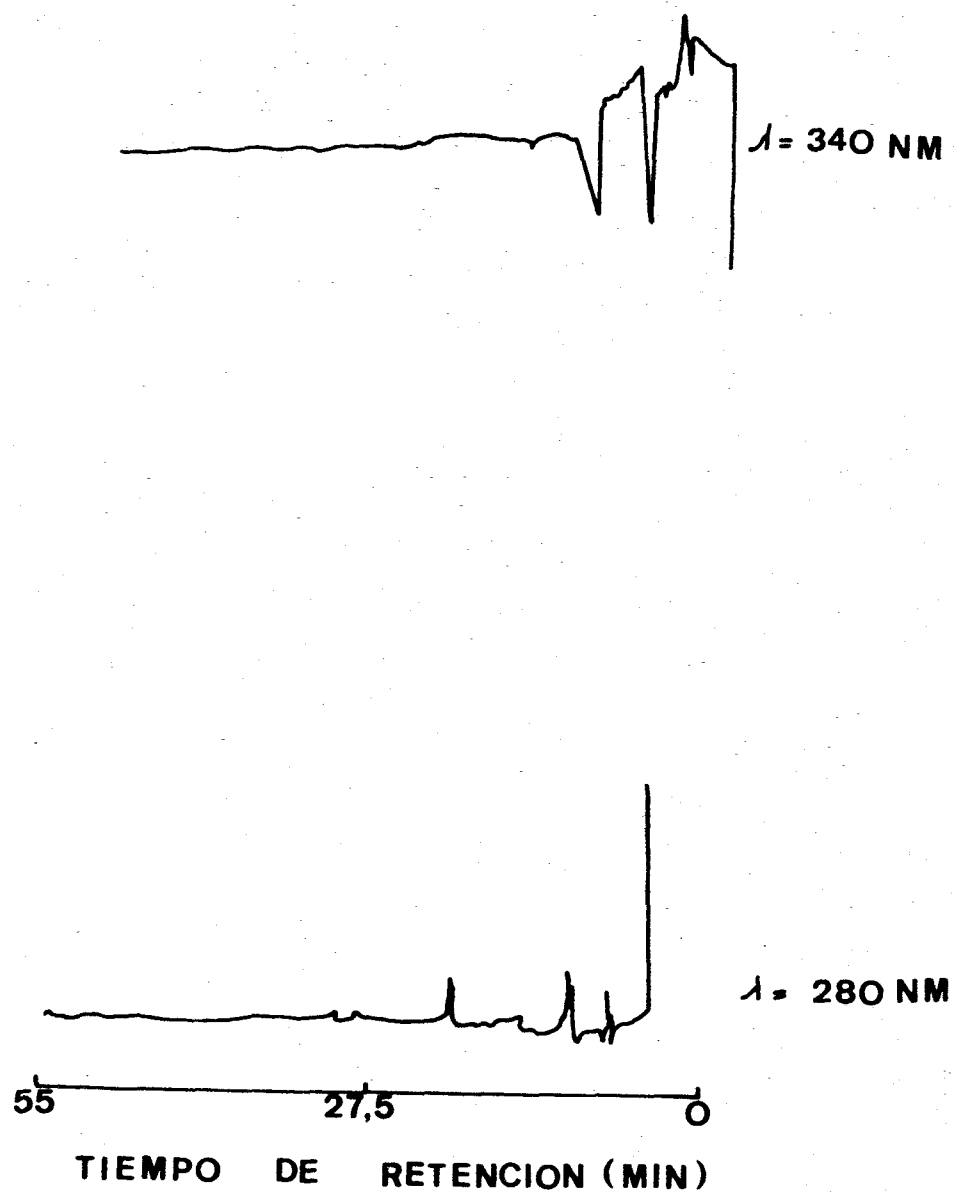


Figura 6. Cromatograma obtenido por CLAE del extracto etéreo de las preparaciones de pigmento no sometidas a ningún tratamiento previo.

I.1.2. COMPUESTOS AROMATICOS LIBRES TRAS OXIDACION CON OXIDO DE COBRE.

Tras la oxidación con óxido de cobre (Kögel and Bochter, 1965) de las preparaciones de pigmento se detectaron por CLAE los siguientes compuestos aromáticos (Figura 7):

- Aldehido protocatéquico
- Acido p-hidroxibenzoico
- Acido vaníllico
- Acido siríngico
- p-vanillina
- Acido p-hidroxifenil propiónico
- Siringaldehido
- Acido p-cumárico
- Acido ferúlico

Excepto en los casos del aldehido protocatéquico y de los ácido p-hidroxifenil propiónico y ferúlico, todos estos compuestos fueron confirmados por CCF (Figura 8).

I.2. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y ESPECTROFOTOMETRIA DE MASAS

Los extractos etéreos de las preparaciones de pigmento fueron sometidos a cromatografía de gases obteniéndose el perfil indicado en la figura 9. A continuación los picos fueron caracterizados por espectrofotometría de masas obteniéndose los compuestos indicados en la tabla 3. De todos ellos se han caracterizado como pertenecientes al pigmento solamente 3 de tales compuestos, correspondientes a los picos 8, 11 y 12 de la figura 9.

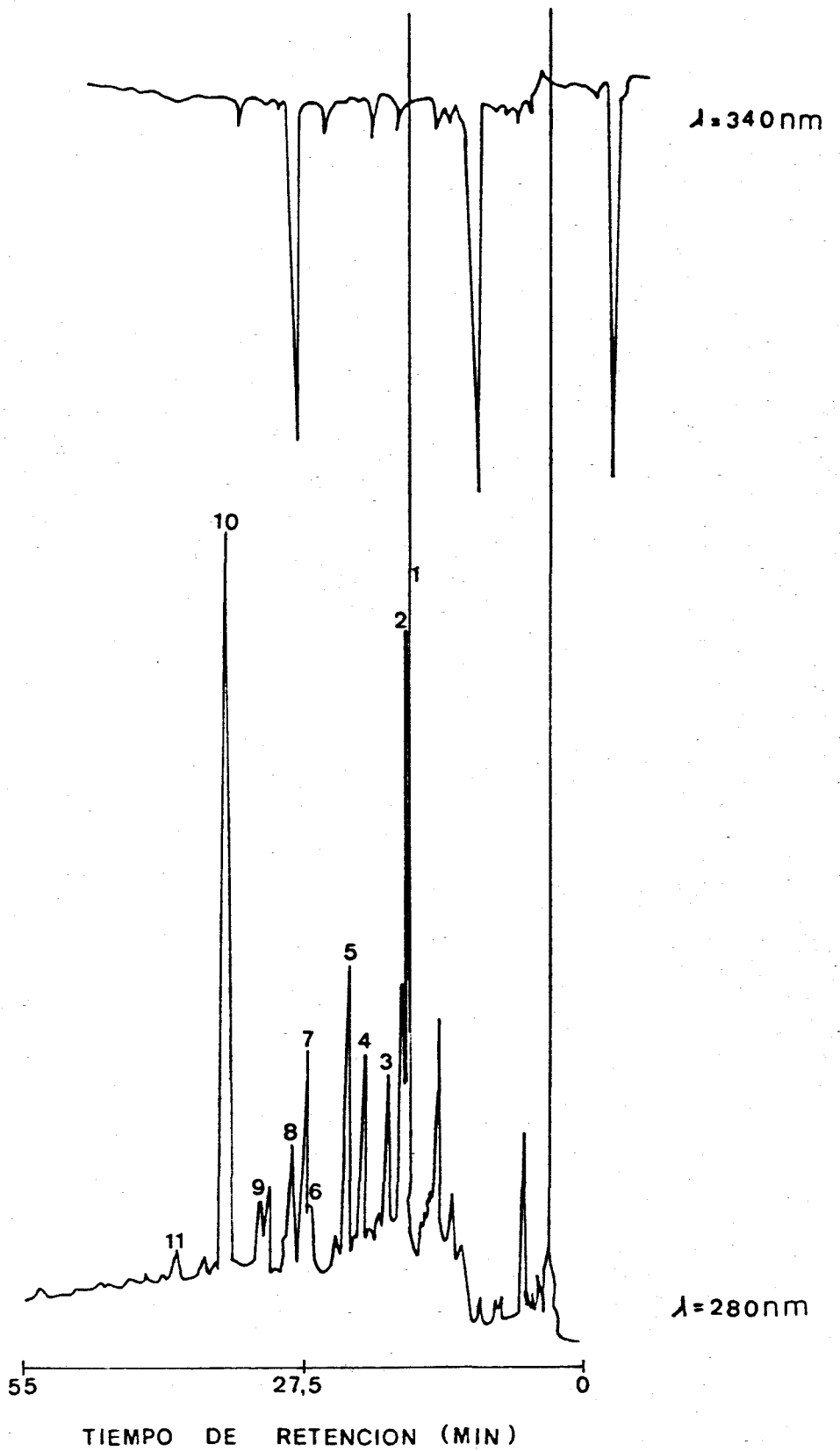


Figura 7. Cromatograma obtenido por CLAE de los extractos etéreos de las preparaciones de pigmento sometidas a oxidación con óxido de cobre. 1:Aldehído protocatéquico; 2:Tirosol; 3:Acido p-hidroxibenzoico; 4:p-hidroxibenzaldehído; 5:Acido vanílicico; 6:Acido siríngico; 7:p-vanillina; 8:Acido p-hidroxifenil propiónico; 9:Siríngaldehído; 10:Acido p-cumárico; 11:Acido ferúlico

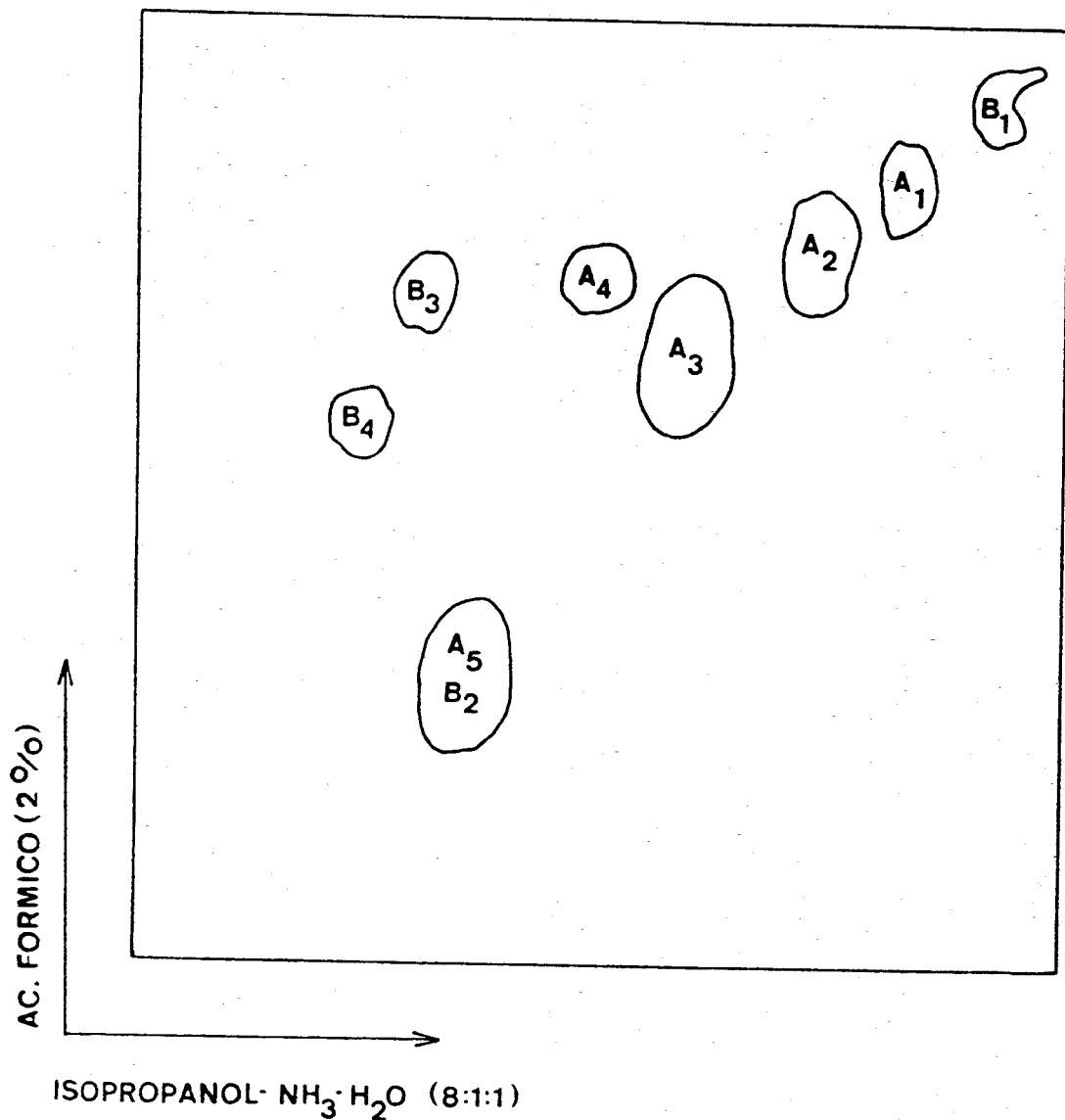


Figura 8. Cromatograma en capa fina de los extractos etéreos de las preparaciones de pigmento tras tratamiento con óxido de cobre. A: Revelado con acetato y observado a 360 y 254 nm. B: Revelado con acetato sódico, p-nitroanilina y carbonato sódico. A₁: p-hidroxibenzaldehído, A₂: p-vanillina; A₃: Siringaldehído; A₄ y A₅: Ácido p-cumárico; B₁: Tiroso; B₂: Ácido p-cumárico; B₃: Ácido p-hidroxibenzoico; B₄: Ácido vanílico.

Tabla 3. Caracterización por espectrofotometría de masas de los picos recogidos en la Figura 9.

<u>PICO</u>	<u>COMPUESTO</u>
1	Acido 1,2-benceno dicarboxílico, dietil ester
2	Docoeano (8 Cl 9Cl)
3	Acido 1,2-bencenodicroboxílico, butil 2-
4	Acido eicosanoico (8Cl 9Cl)
5	Docoeano (8Cl 9Cl)
6	Docoeano (8Cl 9Cl)
7	Dotriacontano (8Cl 9Cl)
8	Acido 1,2-benceno dicarboxílico, butil fen
9	Tetratetracontano (8Cl 9Cl)
10	Dotriacontano (8Cl 9Cl)
11	Acido 1,2-benceno dicarboxílico, 3-nitro
12	1-pentacontanol (9Cl)
13	Ciclotetracontanol, 1,7,11-4-
14	Ciclohexano-1-(1,5-dimetil hexil)-4- (4)
15	Octadecanol (8Cl 9Cl)

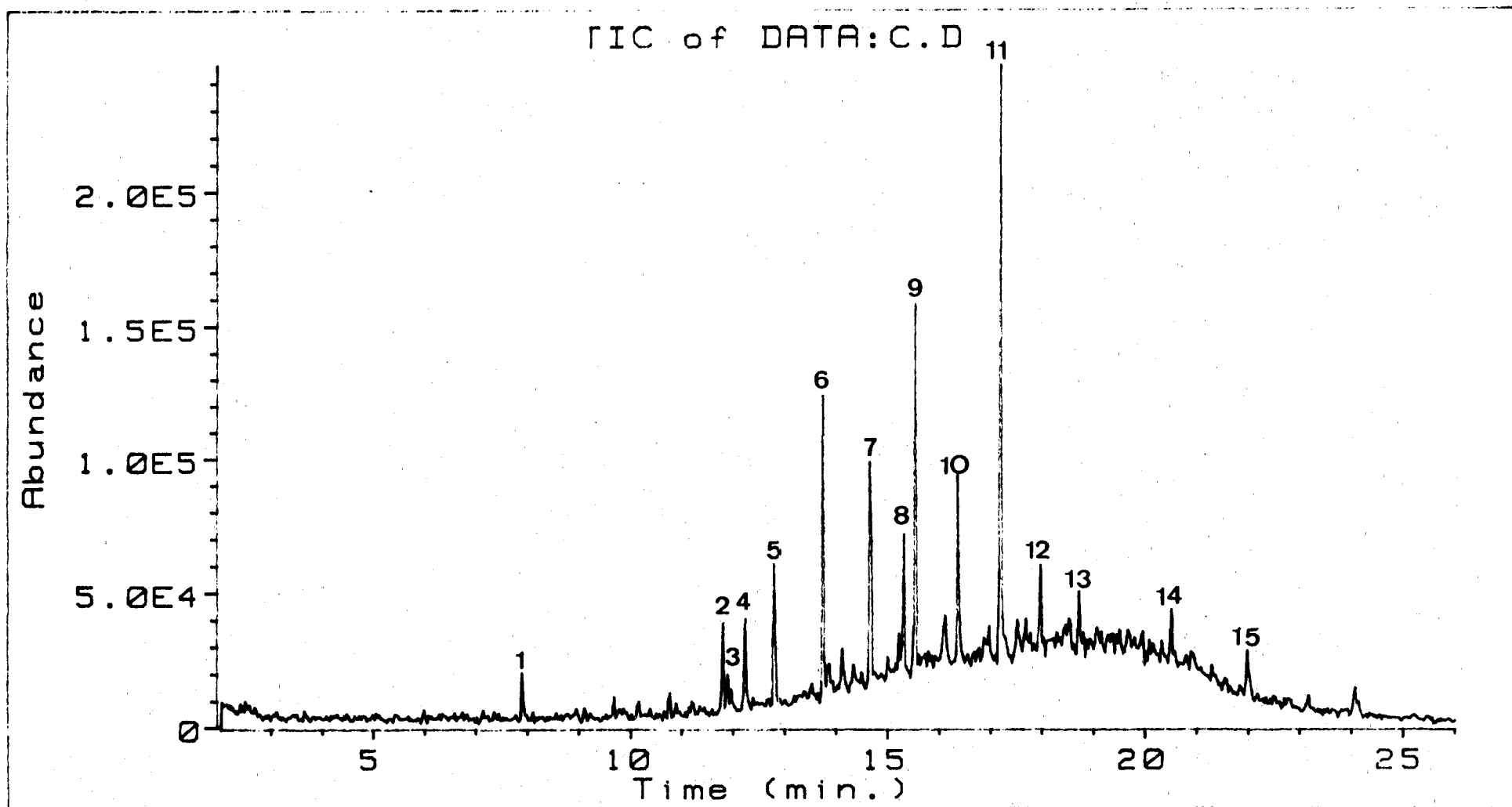


Figura 9. Cromatograma obtenido por cromatografía de gases de los extractos etéreos de las preparaciones de pigmento no sometidas a ningún tratamiento (ver tabla 3)

I.3. FILTRACION POR "SEPHADEX" G-100

La aplicación de este método analítico reveló la existencia de un solo pico, correspondiente a un volumen de elución de ml (Figura 10).

I.4. ESPECTROFOTOMETRIA

I.4.1. INFRARROJA

En la figura 11 se representa el espectro de absorción del pigmento polimérico del alpechín, el cual es muy similar al encontrado por Sáinz Jiménez *et al* (1986). Las principales características que se detectan mediante esta técnica se observan en la figura 11.

I.4.2. VISIBLE

En la figura 12 se reproduce el espectro de absorción en el visible. Se puede observar que esta aumenta progresivamente a medida que disminuye la longitud de onda.

I.4.3. ULTRAVIOLETA

En la figura 13 se representa el espectro de absorción al ultravioleta del pigmento. Se puede comprobar la misma tendencia que en el caso anterior pero existiendo el hombro característico de los polímeros fenólicos (Janshekar *et al*, 1981).

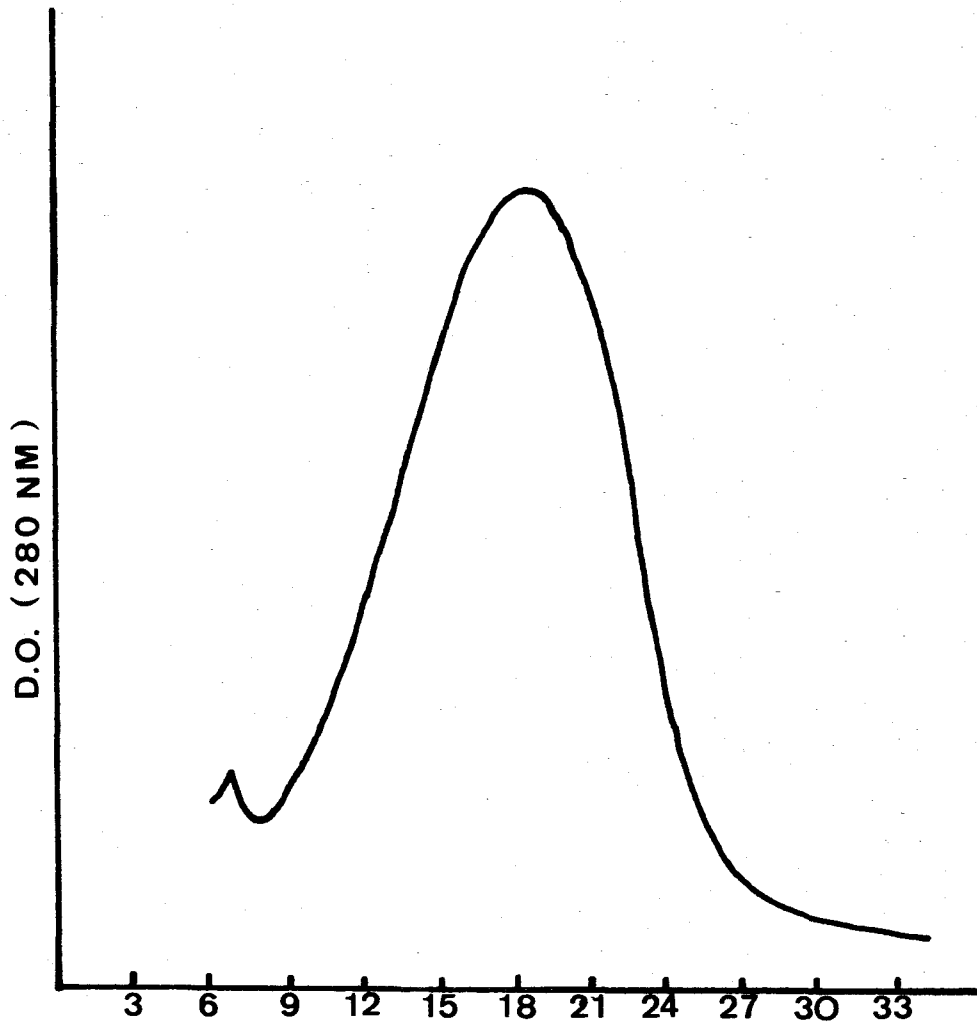


Figura 10. Perfil de elución en "Sephadex G-100" de las preparaciones de pigmento. (Fracciones de 2,5 ml)

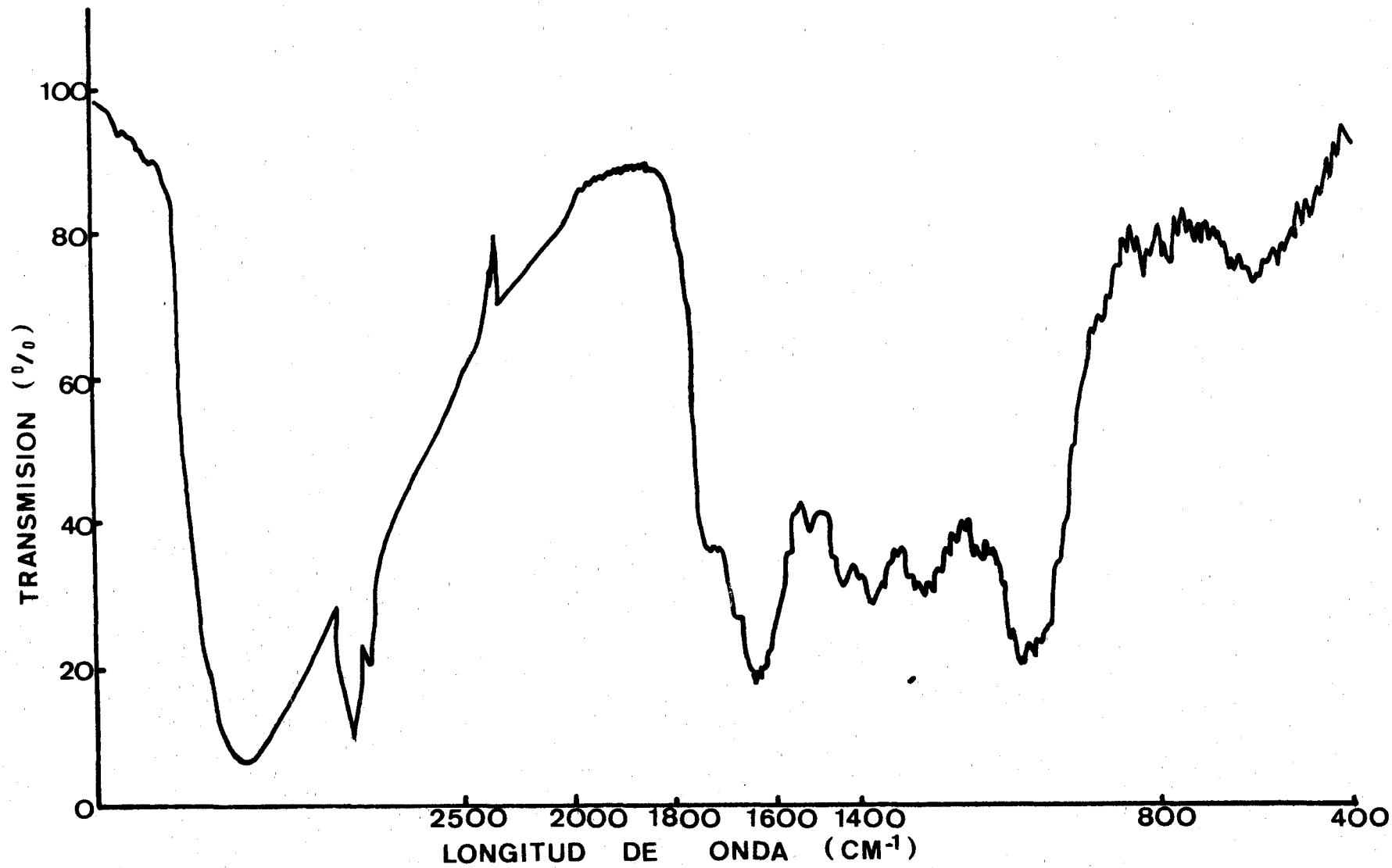


Figura 11. Espectro de infrarrojo de las preparaciones de pigmento.

Tabla 4. Asignaciones de las principales bandas de los espectros de infrarrojos del pigmento.

3400 cm^{-1} : Banda fuerte asociada con grupos OH unidos por puentes de hidrógeno.

2940-2860 cm^{-1} : Banda fuerte correspondiente al esqueleto carbonado. Uniones C-C y C-H.

1600-1800 cm^{-1} : Banda fuerte. Puede corresponderse con los grupos aldehidos, cetonas o ácidos de ésteres. En esta frecuencia también aparecen los anillos aromáticos.

1650-1500 cm^{-1} : Banda fuerte debida a la respiración aromática.

1460-1380 cm^{-1} : Banda fuerte que se asocia a los grupos C-CH₃.

1050-1450 cm^{-1} : Banda fuerte que se asigna a los grupos C-O en grupos carboxilo. Pueden atribuirse también a ácidos grasos.

820-770-640-590 cm^{-1} : Bandas débiles correspondientes a las huellas dactilares. Pueden asociarse a la sustitución en anillos aromáticos.

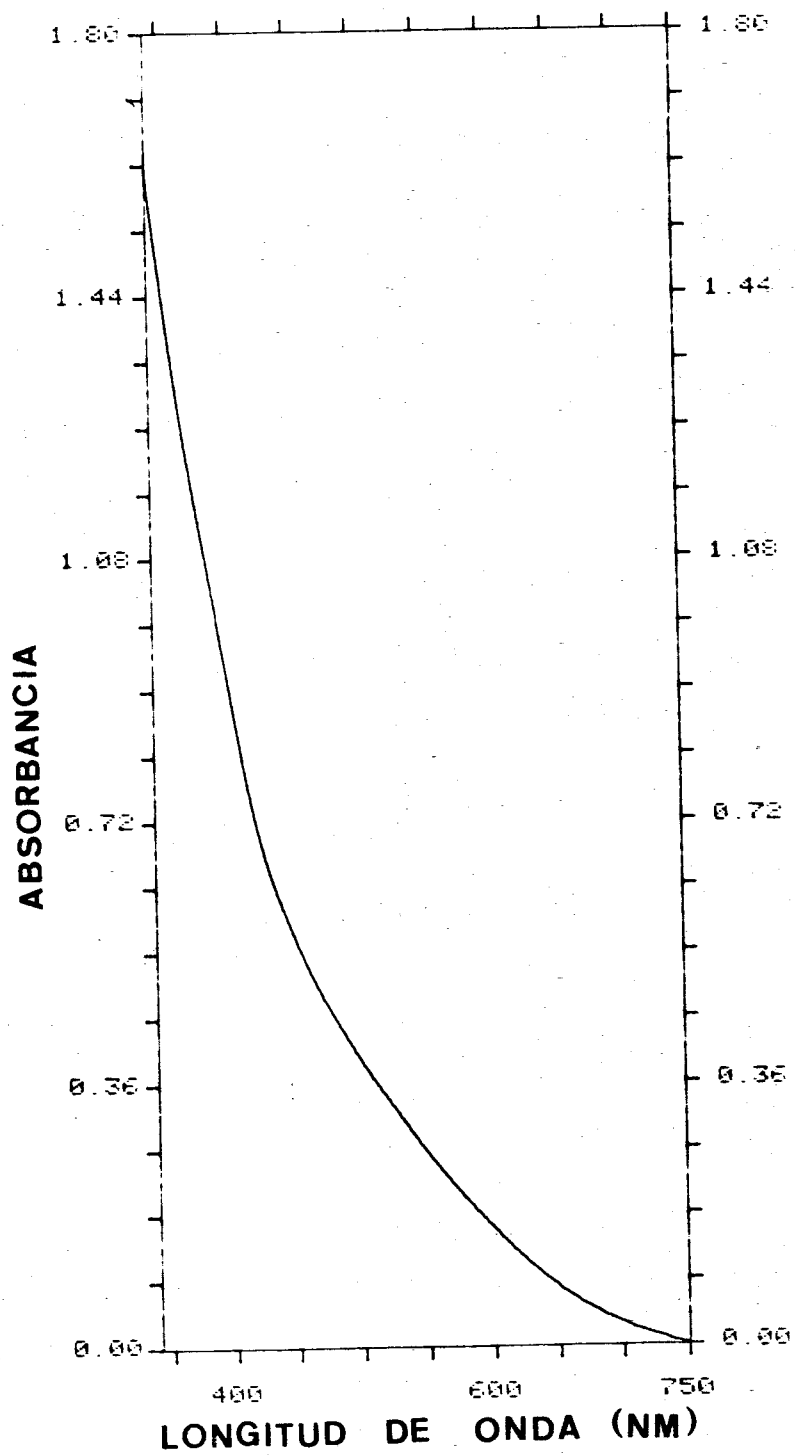


Figura 12. Espectro de absorción visible de las preparaciones de pigmento.

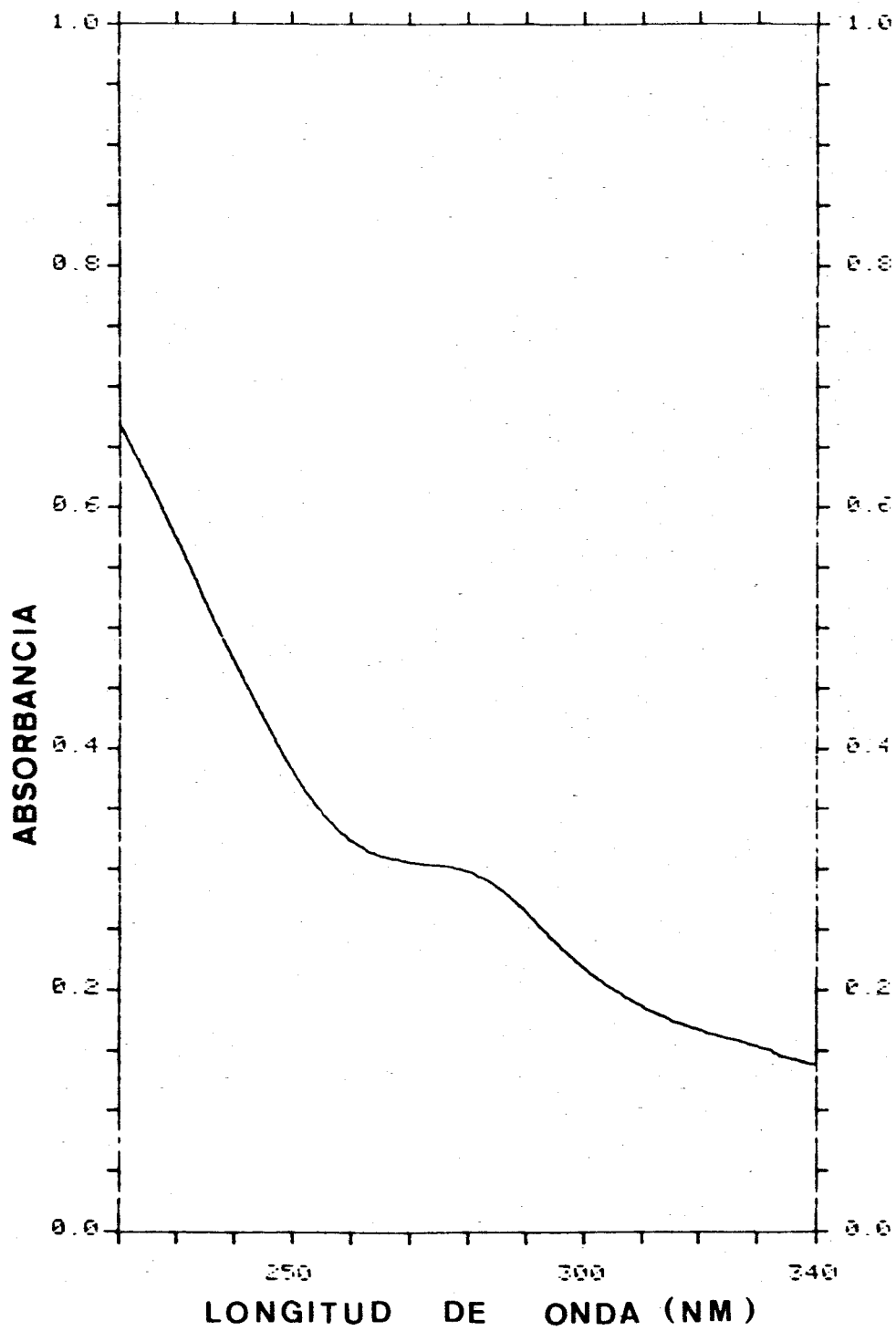


Figura 13. Espectro de absorción ultravioleta de las preparaciones de pigmento.

II. CULTIVOS DE ENRIQUECIMIENTO

II.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Según se ha indicado en material y métodos los inóculos de enriquecimiento se obtuvieron a partir de tres tipos de muestras naturales (Figura 5 de material y métodos).

Se dispusieron los respectivos controles estériles con objeto de usarlos como patrones de color y se realizaron dos tipos de cultivos de enriquecimiento; uno en el cual el pigmento constituía la única fuente de carbono (cultivos ACN, ALN y TBN) y otro suplementado preparado con casaminoácidos y extracto de levadura (cultivos R). Ya que no se apreció ninguna ventaja en la decoloración del pigmento en los cultivos R, solamente se realizaron aislamientos en los cultivos N.

Se aislaron un total de 38 cepas que una vez sometidas a las pruebas convencionales de clasificación y usando los criterios de Ramos Cormenzana (1979), Krieg y Holt (1984) y Sneath *et al* (1986) fueron incluidas en varios grupos taxonómicos (Tabla 5). De ellos el más numeroso corresponde al grupo *Pseudomonas* (25 cepas) que aparece como predominante en los 4 muestreos (15, 30, 60 y 90 días), independientemente del lugar de procedencia de los inóculos (Tabla 6). Este grupo lo hemos subdividido en 6 subgrupos fisiológicos en base a sus propiedades fisiológicas, tal y como aparece en la tabla 5.

Le sigue en número el grupo que hemos incluido bajo la denominación de bacterias corineformas (9 cepas). Sólo dos aislamientos se incluyeron en el género *Bacillus*, uno en la familia *Vibrionaceae* y otro en la *Enterobacteriaceae*.

La proporción (%) de cada uno de los grupos taxonómicos se aprecia en la figura 14).

MORFOLOGIA	GRAM	ASOCIACIONES	CARACTERES COLONIALES	ESPORAS	MOVILIDAD	O/F	OXIDASA	CATALASA	GRUPO	SUBGRUPO
Bacilos cortos	-	-	Pigmento difusible	-	+	O	+	+	} <u>Pseudomonas</u>	(P ₁)
Bacilos delgados	-	-	Amarillo no difusible	-	+	A	+	+		(P ₂)
Bacilos delgados	-	-	Amarillo no difusible	-	+	A	-	+		(P ₃)
Bacilos rechonchos	-	-	No pigmento	-	+	O ^d	+	+		(P ₄)
Bacilos delgados	-	-	Pigmento difusible	-	+	-	+	+		(P ₅)
Bacilos rechonchos	-	-	No pigmento	-	+	O	-	+		(P ₆)
Bacilos largos delgados	-	-	Amarillo no difusible	-	+	F ^d	+	+	} <u>Vibrionaceae</u>	
Variable	V	-	Cremosas grandes	-	-	F(g)	-	+		
Variable	+	-	Amarillo no difusible	-	+	O ^d	-	+	} <u>Corineformes</u>	
Bacilos pequeños	V	Angulares	Amarillo no difusible	-	+	-	-	+		
Variable	V	-	Cremosas	-	+	F ^d	+	+		
Variable	+	-	Amarillo no difusible	-	+	A	-	+		
Variable	+	-	Pequeñas	-	+	O	+	-		
Bacilos grandes	+	+	Grandes	+	+	-	-	+	} <u>Bacillus</u>	
Bacilos deformados en extremo	+	-	Blanquecinas	+	+	-	+	+		
Bacilos grandes	+	-	Blanquecinas	+	+	A	-	+		
Bacilos delgados largos	-	-	Amarillo no difusible	-	+	F	-	+	} <u>Enterobacteriaceae</u>	

Tabla 5. Grupos taxonómicos en los que se han incluido las bacterias aisladas.

V: variable; O: oxidativo; A: alcalinización; F: fermentativo; (g): gases.

Tabla 6. Cepas aisladas de los cultivos de enriquecimiento tras la aplicación del protocolo inicial de aislamiento.

CULTIVO (2)

(1)	Grupo	Subgrupo	ALN	TBN	ACN
Denominación de las cepas					
15	<i>Pseudomonas</i>	P ₁	111, 113	312	514
		P ₃	112	-	513
	Corineforme		115	311	512
30	<i>Pseudomonas</i>	P ₁	-	-	523
		P ₃	122	-	522
		P ₆	124	322	-
	Corineformes		123	-	521
	<i>Enterobacteriaceae</i>		121	-	-
60	<i>Pseudomonas</i>	P ₂	-	-	531
		P ₃	133, 134	-	-
		P ₄	-	333	-
		P ₅	131	331	-
		P ₆	-	334	-
	Corineforme		-	332	532
	<i>Bacillus</i>		-	-	534
<i>Vibrionaceae</i>		132	-	-	
90	<i>Pseudomonas</i>	P ₁	-	-	542
		P ₂	-	345	-
		P ₄	144	342	-
		P ₅	141	341, 344	-
	Corineformes		143	-	541
<i>Bacillus</i>		-	343	-	

(1): Tiempo de incubación (días)

(2): Cultivos inoculados con alpechín (ALN), tierra de la balsa (TBN) y aceitunas (ACN)

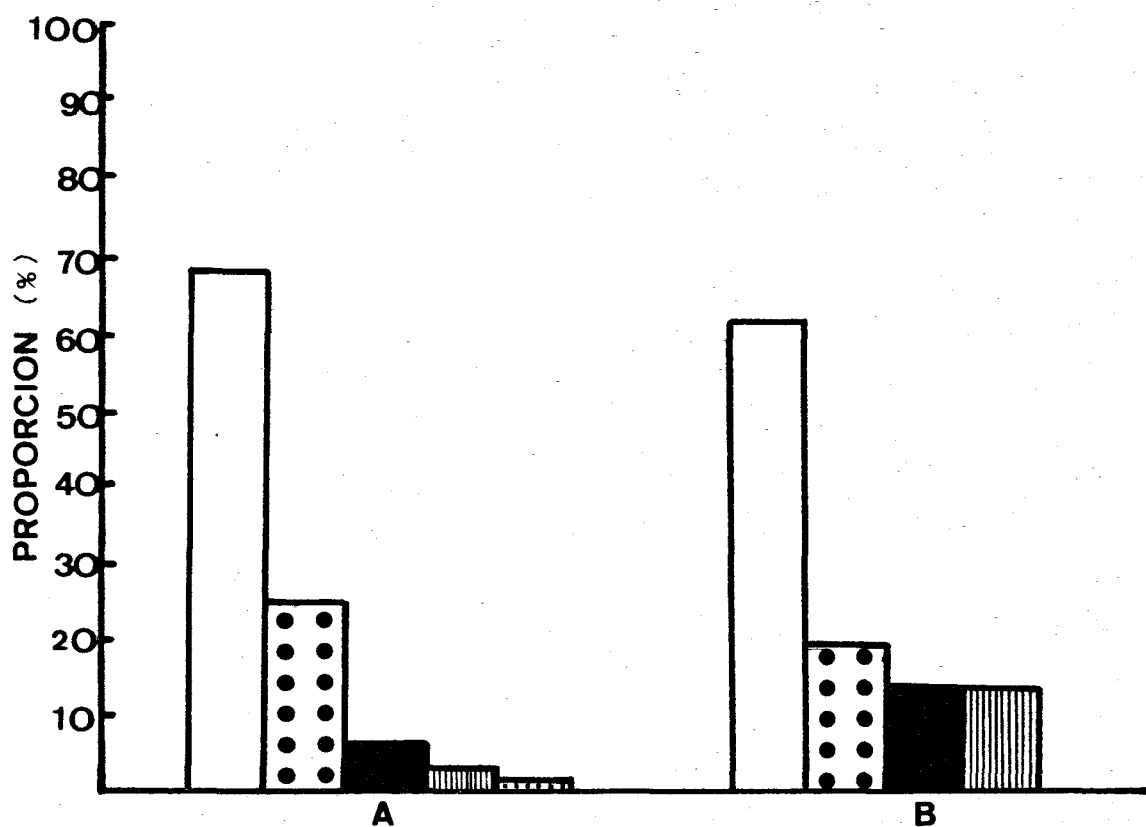


Figura 14. Proporción (%) de los distintos grupos taxonómicos aislados. A: Según el protocolo inicial; B: Cultivos decolorados.

Pseudomonas: ; Corineformes ; *Bacillus*:
 Vibrionaceae: ; Enterobacteriaceae: .

En los cultivos sometidos al protocolo inicial de aislamiento no se observó modificación apreciable de color por lo que, una vez realizado el aislamiento, tales cultivos se siguieron incubando para intentar provocar la decoloración a más largo plazo. Esta fue observada tras mantener los matraces en agitación a 28°C durante 75 días, sobre todo en los cultivos procedentes de los enriquecimientos primarios incubados en reposo durante 90 días, para los tres tipos de inóculo, independientemente de que el cultivo estuviese o no enriquecido con extracto de levadura y casaminoácidos.

Una vez observada la decoloración, tales cultivos fueron sometidos al aislamiento de la flora presente. Así se obtuvo un total de 12 cepas de bacterias (Tabla 7).

Por otra parte, también se observó decoloración en el cultivo ACN de los enriquecimientos primarios incubados en reposo durante 30 días. Este, tras ser sometido a los aislamientos según el protocolo inicial se mantuvo en agitación a 28°C hasta que se observó la modificación del color al cabo de 60 días. De este matraz se aislaron un total de 5 cepas (Tabla 7).

Por tanto el número global de cepas aisladas de los matraces decolorados fueron 17, que se sometieron a los mismos criterios de clasificación que las del protocolo inicial. Se puede observar que la proporción de los distintos grupos taxonómicos es muy similar en ambas experiencias (Figura 14) aunque en los matraces decolorados disminuye ligeramente la proporción de *Pseudomonas* y corineformes, y aumenta *Bacillus* y *Vibrionaceae*. En general se podría decir que la flora microbiana es muy similar en los cultivos de enriquecimiento sin ningún cambio apreciable de color, como en los decolorados.

Sin embargo, si comparamos el tipo de inóculo del que proceden los distintos grupos aislados en ambas experiencias podemos apreciar que hay ligeras variaciones (Tablas 8 y 9). La más significativa ocurre en el grupo *Pseudomonas* ya que según el protocolo inicial se aíslan un 40% de los cultivos ALN mientras que en los decolorados no se aísla ninguno. Es también de destacar que los *Bacillus* aislados de los matraces decolorados sean todos de los cultivos ALN.

Tabla 7. Cepas aisladas de los cultivos decolorados procedentes de los muestreos realizados sobre los cultivos decolorados a los 30 y 90 días de incubación.

CULTIVO (2)

(1)	Grupo	Subgrupo	ALN	TBN	ACN
Denominación de las cepas					
30	<i>Pseudomonas</i>	P ₁	-	-	922
		P ₂	-	-	921
		P ₄	-	-	924
	<i>Vibrionaceae</i>		-	-	923, 925
90	<i>Pseudomonas</i>	P ₁	844, 845	-	942
		P ₂	843	-	944
		P ₃	842	-	-
		P ₄	-	-	943
	<i>Bacillus</i>		-	741, 746	-
	Corineforme		-	743, 747	941

(1): Tiempo de incubación (días)

(2): Cultivos inoculados con alpechín (ALN), tierra de la balsa (TBN) y aceitunas maduras (ACN).

Tabla 8. Procedencia de los distintos grupos taxonómicos aislados según el protocolo inicial.

GRUPOS TAXONOMICOS	TOTAL	CULTIVO(1)		
		ALN	TBN	ACN
<i>Pseudomonas</i>	25	10	9	6
Corineformes	9	3	2	4
<i>Bacillus</i>	2	0	1	1
<i>Vibrionaceae</i>	1	1	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	1	0	0

(1): Ver tabla 6.

Tabla 9. Procedencia de los distintos grupos taxonómicos aislados en los cultivos decolorados procedentes del enriquecimiento primario de los 90 días.

GRUPOS TAXONOMICOS	CULTIVOS(1)			
	TOTAL	ALN	TBN	ACN
<i>Pseudomonas</i>	7	0	4	3
Corineformes	3	2	0	1
<i>Bacillus</i>	2	2	0	0

(1): Ver tabla 6.

Si estudiamos la proporción de los distintos grupos taxonómicos minoritarios, *Bacillus* y *Vibrionaceae* a partir de los cultivos de enriquecimiento de los 60 días, estos no se aíslan ni a los 15 ni a los 30 días (Tabla 10).

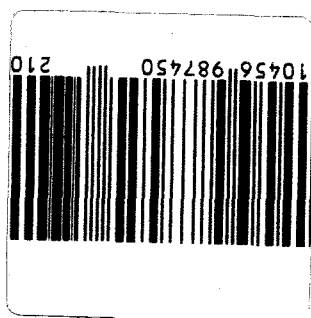


Tabla 10. Proporción (%) de los grupos taxonómicos mayoritarios obtenidos en cada uno de los aislamientos efectuados en los cultivos de enriquecimiento.

TIEMPO DE INCUBACION (DIAS)	<i>Pseudomonas</i>	Corineformes
15	66,6 %	33,3 %
30	62,5 %	25,0 %
60	63,6 %	18,1 %
90	70,0 %	20,0 %
30 días decolorados	60,0 %	40,0 %
90 días decolorados	58,3 %	25,0 %

II.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA CEPA DE *Aspergillus terreus*

En los cultivos decolorados obtenidos mediante la modificación del protocolo inicial de aislamiento, era posible, en ciertos casos, reproducir la decoloración por resiembras sucesivas de la población microbiana natural desarrollada en ellos. Tal decoloración era observada solamente tras periodos de incubación muy largos (2 ó 3 meses). Además, como ya se ha indicado, la población microbiana aislada se asemeja en sus rasgos generales con la colección procedente del protocolo inicial de aislamiento, desconociendo por tanto las peculiaridades de los microorganismos presentes que pudieran explicar el distinto comportamiento de la coloración.

Para paliar los dos inconvenientes anteriores (tiempos largos de incubación y el tener que trabajar con una población mixta desconocida) fue necesario modificar la metodología seguida en los enriquecimientos.

A) AISLAMIENTO

Para el aislamiento de un microorganismo capaz de decolorar los medios de cultivo fue necesario además de alterar el protocolo inicial de aislamiento, modificar la composición del medio de cultivo introduciendo una fuente de carbono alternativa y variando la relación C/N de la solución nutritiva.

En la figura 15 se muestran los pasos seguidos en la obtención de *Aspergillus terreus*. Tras la inoculación (al 10 %) de estos medios de cultivo se incubaron en reposo a 28°C durante 6 días. En todos los cultivos con una fuente de carbono alternativa se manifestó la presencia de un hongo que hasta entonces no había sido detectado y cuyo crecimiento se indica orientativamente en la tabla 11. En esta misma tabla se aprecia que la decoloración sólo se detectó en los cultivos en los que se desarrolló el hongo.

Para intentar el aislamiento de los microorganismos implicados se realizó una nueva siembra sobre el medio de cultivo respectivo a partir de los matraces más decolorados, los adicionados de glucosa y

Figura 15. Protocolo seguido para el aislamiento de *Aspergillus terreus*

ACN-30

3 meses a 28°C

Resiembra (10%) en distintos medio de cultivo

1	N ₁	G ₁	NG ₁	Et ₁	NEt ₁
2	N ₂	G ₂	NG ₂	Et ₂	NEt ₂

9 días a 28°C

Selección de decolorados

G₁ _____ Et₁

Aislamiento sobre TSA y Sabouraud

Resiembra al 10 %

G_{1,1} _____ Et_{1,1}

Incubar 6 días a 28°C

1; Cultivos con pigmento como única fuente de carbono

N₁; Cultivos con pigmento como única fuente de carbono y limitado en nitrógeno

G₁; Cultivos con pigmento y glucosa como fuente de carbono

NG₁; Cultivos con pigmento y glucosa como fuente de carbono

Et₁; Cultivos con pigmento y etanol como fuente de carbono

NEt₁; Cultivos con pigmento y etanol como fuente de carbono y limitado en nitrógeno.

2, G₂, Et₂, NG₂, Et₂ y NEt₂; Controles estériles.

etanol (G₁ y Et₁). Tras 3 días de incubación de nuevo fue visible la decoloración y el desarrollo del hongo en ambos cultivos, más abundante en los cultivos con glucosa (G₁₁) que en los añadidos de etanol (Et₁₁). La decoloración de estas resiembras se indica también en la tabla 15.

Para su aislamiento en cultivo puro se sembraron placas de Sabouraud, agar-malta y TSA (apartado III de material y métodos). El crecimiento microbiano sobre estos medios de cultivo determinó el aislamiento inicial de dos cepas, que posteriormente fueron caracterizadas como pertenecientes a la misma especie, por las pruebas microscópicas y morfológicas que se detallan más adelante.

B) IDENTIFICACION

Tras las pruebas microscópicas la cepa aislada del enriquecimiento con glucosa fue sembrada en agar Czapek (30 % de sacarosa) donde las colonias crecen rápidamente presentando un diámetro de 49-50 mm en 12 días y a 27°C. Su aspecto es aterciopelado, surcada radialmente, ligeramente flocosa y de márgenes transparentes. Presenta abundante esporulación y tonalidades canela en la zona marginal, zona central de color beig (Figura 16). Produce exudado de color ámbar, principalmente en la zona central. No posee olor característico. Reverso de color amarillo marronáceo (Figura 16). Pigmento difusible de color amarillo. Presenta cabezas conidiales alargadas de aspecto columnar y compacto (Figura 17). Conidióforos incoloros de paredes lisas.

Tiene vesículas semiesféricas de 7-14,5 μ m de diámetro. Fiálidas en dos series, los primarios de 5,5-6,5 μ m por 1,8-2,7 μ m y los secundarios 4,5-6,5 μ m por 1,8-2,7 μ m de diámetro. En el micelio vegetativo aparecen células globosas u ovals.

En agar-extracto de malta las colonias crecen rápidamente midiendo 60-70 mm a los 12 días y a 27°C y aspecto plano con abundante esporulación. Reverso ligeramente amarillento. No posee olor característico ni presenta gotas de exudado. Carece de pigmento difusible en el medio. Las características conidiales son semejantes a las descritas en agar Czapek.

Tabla II. Decoloración de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *Aspergillus terreus* según la ecuación propuesta por Fukuzumi (1981):

$$1 - \frac{\text{Absorbancia del cultivo}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

	I	N ₁	G ₁	NG ₁	Et ₁	NEt ₁	G ₁₁	Et ₁₁
Decoloración	-8,69	-9,09	37,50	13,64	65,22	-2,32	79,17	56,52
Crecimiento(1)	-	-	+++	+	++	+	+++	++

(1) Crecimiento semicuantitativo del hongo

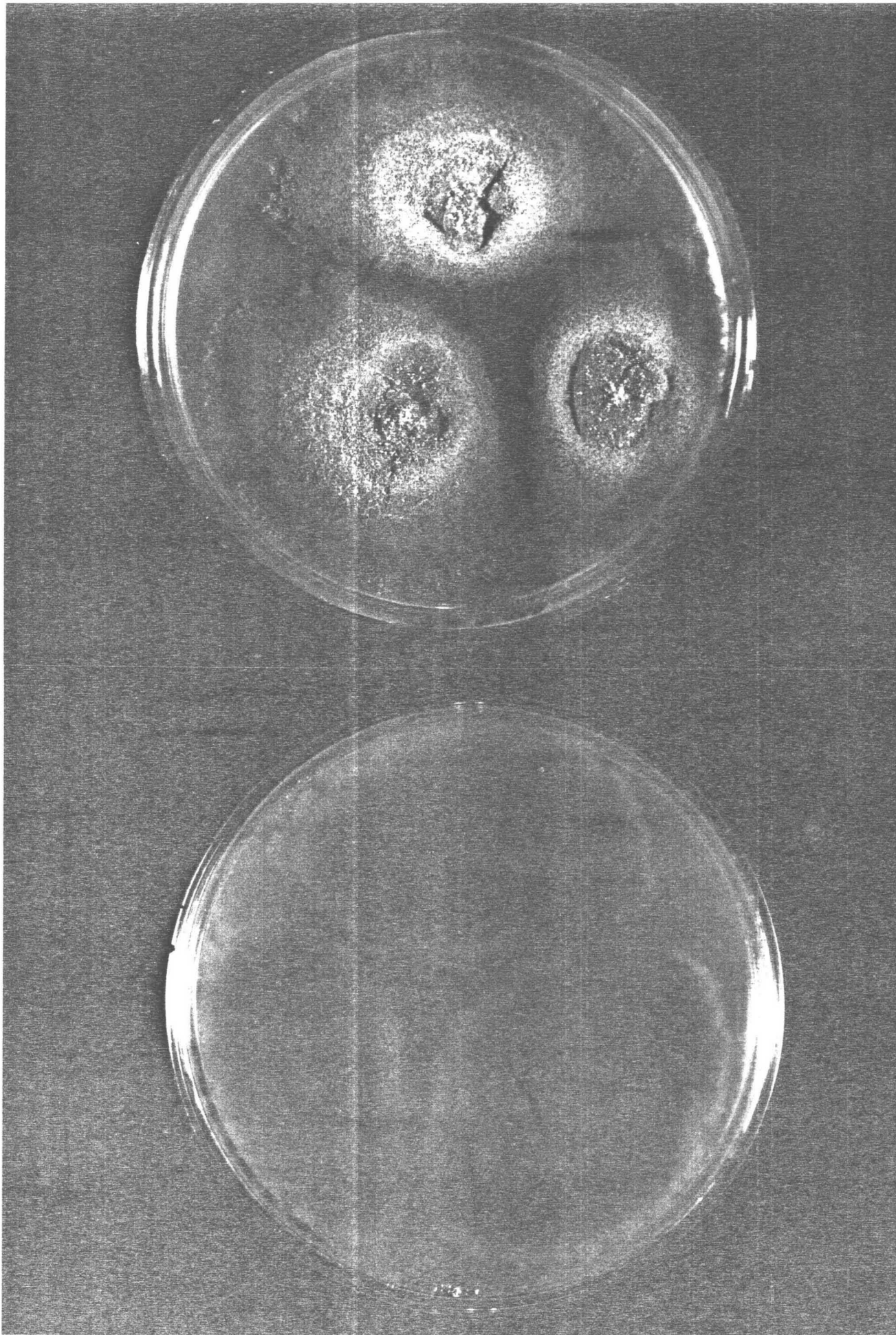


Figura 16. Morfología de las colonias de Aspergillus terreus en agar Czapek.

Su morfología al microscopio ^{de contraste} se puede observar en la figura 18.

Por todas las características estructurales y morfológicas el hongo aislado quedó identificado como *Aspergillus terreus* Thom.

III. TRANSFORMACION DE COMPUESTOS AROMATICOS DEL ALPECHIN

III.1. DE COMPUESTOS AROMATICOS DE BAJO PESO MOLECULAR

Una vez aisladas y caracterizadas las bacterias, se ensayó la capacidad de degradar la mezcla de los ácidos fenólicos descritos en el alpechín por Balice y Cera (1984).

Las bacterias se cultivaron en TSB según se indica en el apartado III de material y métodos. Tras 24 horas de incubación en agitación se inoculó el medio mínimo que contenía la mezcla de ácidos fenólicos (0,83 mM) como única fuente de carbono y energía.

III.1.1. EFECTO DEL TIPO DE INOCULO SOBRE EL CONSUMO DE ACIDOS AROMATICOS

Con objeto de determinar las mejores condiciones de cultivo para ensayar la degradación sin incrementar excesivamente la complejidad del medio de cultivo se realizó un experimento preliminar determinando la influencia que la presencia de restos del medio de cultivo del inóculo ejercía sobre la capacidad de degradación. Para ello se eligieron 8 cepas representativas de los 8 grupos mayoritarios (6 *Pseudomonas* y 2 corineformes), ensayándose su capacidad metabolizadora en cultivos realizados inoculando (al 10 %) directamente y tras la eliminación del medio de cultivo por centrifugación y resuspensión en solución salina estéril.

En las tablas 12 y 13 se muestra la cantidad de ácidos fenólicos (en μ g/ml) consumida en cada caso. Estos valores se han obtenido restando a cada control la cantidad correspondiente de ácido fenólico residual registrada por el cromatógrafo. Estos resultados se indican gráficamente en la figura 19.

Puede apreciarse el consumo de una mayor variedad y cantidad de sustrato carbonado cuando se utilizó el inóculo directamente. Por ello se eligió esta metodología en los experimentos sucesivos.

Tabla 12. Consumo ($\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los ácidos fenólicos por las cepas seleccionadas. Inóculo en solución salina.

CEPA	ACIDO (1)				
	4FA (130 $\mu\text{g/ml}$)	VAN (140 $\mu\text{g/ml}$)	CAF (150 $\mu\text{g/ml}$)	SIR (170 $\mu\text{g/ml}$)	VER (150 $\mu\text{g/ml}$)
<i>Pseudomonas</i>					
113	0	0	39,15	0	0
331	0	0	26,04	0	0
334	96,80	0	37,07	0	0
341	0	0	48,88	0	0
344	0	0	45,22	0	0
541	125,58	0	44,52	0	0
<i>Corineformes</i>					
123	130,00	140,00	133,89	154,70	0
542	130,00	12,65	39,58	0	0

(1): Entre paréntesis se indica la concentración inicial.

Tabla 13. Consumo ($\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los ácidos por las cepas seleccionadas. Inóculo directo de los precultivos en TSB.

CEPA	ACIDO (1)				
	4FA (130 $\mu\text{g/ml}$)	VAN (140 $\mu\text{g/ml}$)	CAF (150 $\mu\text{g/ml}$)	SIR (170 $\mu\text{g/ml}$)	VER (150 $\mu\text{g/ml}$)
<i>Pseudomonas</i>					
113	130,00	140,00	79,22	70,75	0
331	130,00	140,00	94,39	108,14	17,78
334	0	0	0	0	0
341	130,00	138,38	54,99	84,60	0
344	130,00	0	0	0	0
541	130,00	22,25	150,00	2,07	0
<i>Corineformes</i>					
123	130,00	140,00	125,19	127,76	11,33
542	130,00	140,00	77,71	68,78	5,78

(1): Entre paréntesis se indica la concentración inicial.

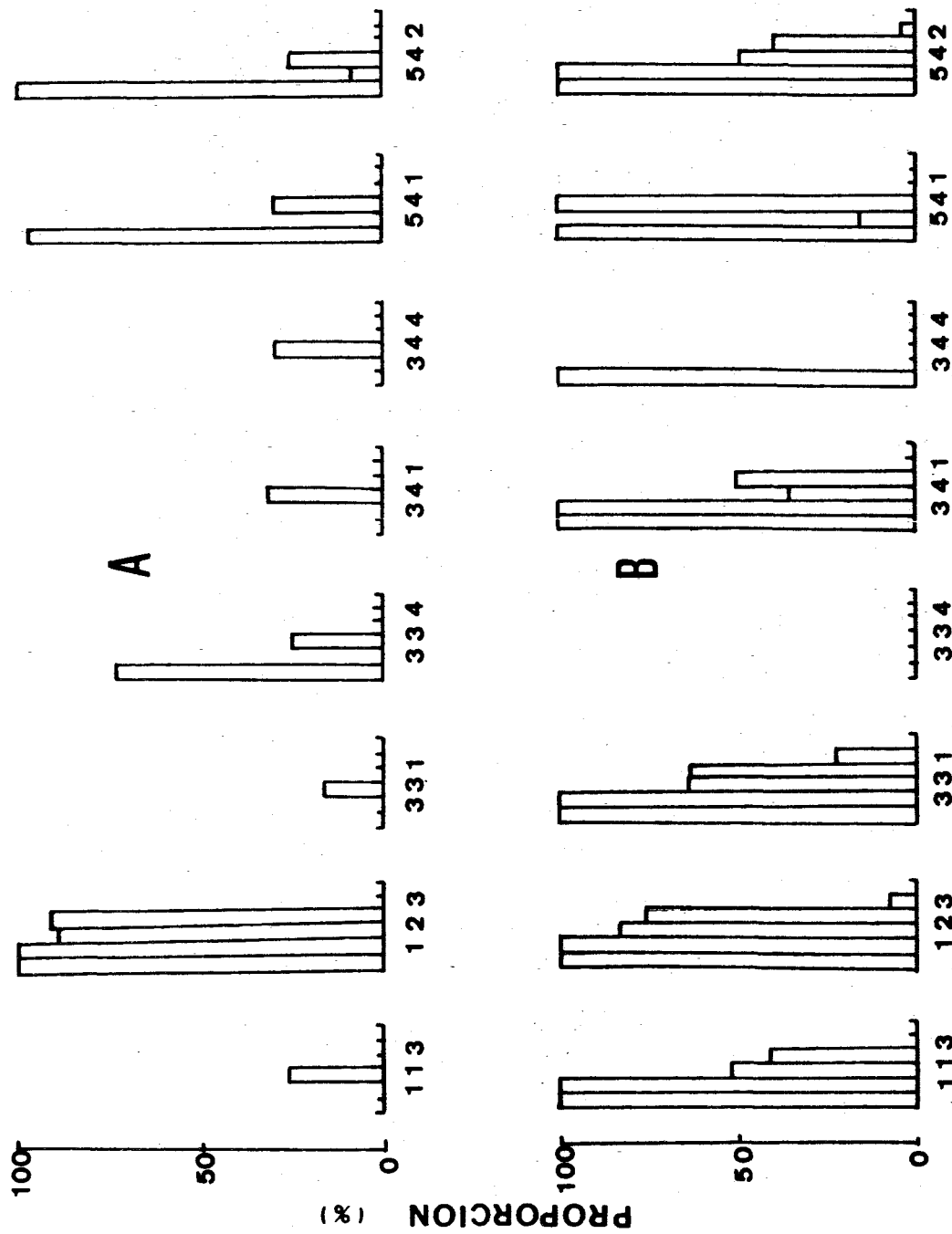


Figura 19. Consumo (%) de los componentes de la mezcla descritos en el alpechín por Balice y Cera (1984). A: utilizando inóculos lavados y suspendidos en solución salina; B: utilizando inóculos directos de TSB. En los histogramas se representa de izquierda a derecha los ácidos: p-hidroxifenil acético, vanillico, cafeico, siríntrico, verátrico y 3,4,5 trimetoxi benzoico.

III.1.2. DEGRADACION DE LA MEZCLA DE ACIDOS FENOLICOS POR LAS CEPAS AISLADAS

Se ensayó la actividad de las cepas procedentes del protocolo inicial de aislamiento (Tablas 14, 15 y 16), así como de la procedente de los cultivos decolorados (Tabla 17). Los mismos resultados se indican gráficamente en la figuras 20, 21, 22 y 23.

Si consideramos sólo las cepas que son capaces de degradar más de un 50% de los distintos ácidos fenólicos podemos observar (Figura 24) que el ácido cafeico se consume por un mayor número de bacterias. En aproximadamente la misma proporción se degrada el p-hidroxifenil acético. Le siguen en frecuencia de degradación el vanillico y el siríngico. El varátrico es utilizado por 4 cepas, mientras que el 3,4,5, trimetoxibenzoico no es degradado en cantidad superior al 50 % por ninguna de las cepas en las condiciones utilizadas.

Si consideramos a una cepa como degradadora de determinado ácido si en su sobrenadante se detecta menos de un 50% de la cantidad inicial podemos agrupar las bacterias en 13 patrones de degradación (Tabla 18 y figuras de 25 a 38).

Se observa (Tabla 18) que 25 de las 38 cepas obtenidas en el protocolo inicial de aislamiento (68,5%) y 13 de las 17 (76,5%) procedentes de los matraces decolorados consumen dos o menos ácidos.

Del protocolo inicial 13 cepas (34,2%) consumen 3 ó más ácidos fenólicos mientras que en los matraces decolorados sólo 4 cepas son capaces de degradarlos.

En la tabla 18 también se aprecia que hay 11 cepas que son incapaces de utilizar ninguno de los 6 ácidos fenólicos. Pertenecen a este grupo el 100% de *Bacillus*, 4 cepas de *Pseudomonas*, 2 bacterias corineformes y una *Vibrionaceae*.

Quince cepas (10 del protocolo inicial) utilizan uno solo de los ácidos fenólicos, 4 de ellas el 4-hidroxifenil acético y 11 el cafeico. Estos son los únicos ácidos que son consumidos por las bacterias sin la degradación paralela de algún otro. Destaca que de las 11 cepas que utilizan únicamente cafeico, 10 pertenecen al grupo *Pseudomonas*.

Tabla 14. Consumo ($\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los ácidos fenólicos por las cepas procedentes de los cultivos ALN.

CEPA	ACIDOS (1)					
	4FA	VAN	CAF	SIR	VER	TMB
	(130 $\mu\text{g/ml}$)	(140 $\mu\text{g/ml}$)	(150 $\mu\text{g/ml}$)	(170 $\mu\text{g/ml}$)	(150 $\mu\text{g/ml}$)	(180 $\mu\text{g/ml}$)
111	130,0+16,1	44,0+16,9	150,0+12,1	0	0	0
112	0	0	132,1+16,1	0	0	0
113	130,0+16,1	140,0+ 3,9	79,2+15,1	70,7+ 7,3	0	0
115	130,0+ 4,5	46,3+ 5,2	150,0+20,1	20,0+ 4,3	20,5+ 5,1	12,2+ 5,9
121	130,0+16,1	140,0+ 3,8	40,2+22,4	170,0+ 2,6	82,7+23,5	16,9+19,15
122	0	0	136,7+ 7,6	0	0	0
123	130,0+16,1	140,0+ 3,8	125,2+12,7	127,8+ 8,3	11,3+11,2	0
124	6,6+16,5	25,4+10,1	150,0+20,6	0	1,9+13,5	0
131	130,0+11,1	140,0+11,9	87,4+10,7	145,6+10,9	78,8+15,7	42,9+15,1
132	30,9+14,9	132,9+13,7	111,2+11,1	104,5+10,4	57,4+10,0	39,7+11,7
133	130,0+11,1	73,8+15,5	150,0+10,5	48,6+23,0	34,7+16,5	38,5+22,4
134	4,3+13,8	34,9+ 4,1	150,0+10,5	13,5+ 2,1	10,6+ 3,5	2,9+ 6,6
141	130,0+ 4,5	131,4+ 5,8	97,1+20,9	93,6+12,7	3,9+ 9,2	0
143	0	128,5+ 8,9	100,8+22,9	18,9+19,1	0	0
144	6,5+ 8,0	0	117,7+9,2	7,2+ 9,0	0	0

(1) Entre paréntesis se indica la concentración inicial de cada ácido.

Tabla 15. Consumo ($\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los ácidos fenólicos por las cepas procedentes de los cultivos TBN.

ACIDOS (1)

CEPA	4FA (130 $\mu\text{g/ml}$)	VAN (140 $\mu\text{g/ml}$)	CAF (150 $\mu\text{g/ml}$)	SIR (170 $\mu\text{g/ml}$)	VER (150 $\mu\text{g/ml}$)	TMB (180 $\mu\text{g/ml}$)
311	130,0+16,1	35,2+ 4,2	150,0+12,1	0	0	0
312	130,0+16,1	134,4+ 4,2	46,2+27,7	135,5+11,3	82,9+24,8	59,3+55,2
322	0	27,9+ 3,8	0	0	0	33,3+ 4,8
331	130,0+16,1	140,0+ 3,8	94,4+13,1	108,1+ 5,6	17,8+ 9,4	0
332	130,0+11,1	46,9+12,8	65,2+11,9	47,1+11,0	37,2+10,1	41,9+12,5
333	130,0+ 4,5	11,4+ 3,3	91,6+22,4	0	0	0
334	0	0	0	0	0	0
341	130,0+16,1	138,4+ 4,1	55,0+24,7	84,6+11,4	0	0
342	0	0	19,2+13,1	0	0	0
343	0	0	65,0+ 9,2	0	0	0
344	130,0+16,1	0	0	0	0	0
345	130,0+ 1,1	4,2+ 4,8	109,9+ 9,5	0	0	0

(1) Entre paréntesis se indica la concentración inicial de cada ácido.

Tabla 16. Consumo ($\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los ácidos fenólicos por las cepas procedentes de los cultivos ACN.

CEPA	ACIDO (1)					
	4FA (130 $\mu\text{g/ml}$)	VAN (140 $\mu\text{g/ml}$)	CAF (150 $\mu\text{g/ml}$)	VAN (170 $\mu\text{g/ml}$)	VER (150 $\mu\text{g/ml}$)	TMB (180 $\mu\text{g/ml}$)
512	130,0+11,1	94,3+12,5	150,0+10,1	43,8+18,0	29,2+12,7	26,7+15,6
513	0	44,8+31,4	135,3+17,4	14,4+31,7	5,6+28,7	49,6+37,8
514	0	42,8+12,4	125,1+23,7	18,5+10,2	9,3+ 9,2	53,3+11,4
521	0	0	48,8+10,5	0	0	0
522	0	39,4+25,1	134,6+10,9	7,9+10,1	0	49,9+15,2
523	130,0+11,1	130,4+12,5	20,9+21,1	130,3+11,5	73,8+12,8	40,9+38,2
531	130,0+11,1	59,7+19,7	94,7+16,9	59,4+22,7	47,8+20,9	52,6+26,9
532	116,4+ 4,5	14,3+ 6,8	106,3+22,8	5,3+ 5,3	10,8+ 5,8	0
541	130,0+16,1	22,2+10,5	150,0+12,1	2,1+ 8,9	0	0
542	130,0+16,1	140,0+ 3,8	77,7+22,6	68,9+21,8	5,7+21,8	0

(1) Entre paréntesis se indica la concentración inicial de cada ácido.

Tabla 17. Consumo ($\mu\text{g/ml}$) de cada uno de los ácidos fenólicos por las cepas procedentes de los cultivos decolorados.

CEPA	ACIDOS (1)					
	4FA (130 $\mu\text{g/ml}$)	VAN (140 $\mu\text{g/ml}$)	CAF (150 $\mu\text{g/ml}$)	SIR (170 $\mu\text{g/ml}$)	VER (150 $\mu\text{g/ml}$)	TMB (180 $\mu\text{g/ml}$)
921	130,0+ 0,1	26,5+ 5,5	150,0+ 9,1	0	0	0
922	130,0+ 0,1	140,0+ 2,6	99,1+10,0	107,5+ 8,4	50,4+13,6	9,6+16,4
923	130,0+ 0,1	21,4+ 6,6	90,9+14,1	4,1+ 9,1	1,6+ 7,3	1,6+12,8
924	63,2+20,3	12,2+10,3	73,6+12,1	0	0	0
925	0	9,9+ 9,6	0	0	3,1+ 6,9	4,3+ 8,4
741	0	0	0	0	0	0
743	130,0+ 0,1	0	0	0	0	0
746	1,6+ 7,0	2,7+ 8,4	7,5+26,6	0,96+13,7	1,5+11,2	0
747	0	0	0	0	0	0
842	1,7+ 3,3	26,2+ 3,0	150,0+ 9,1	0	0	0
843	130,0+ 0,1	140,0+ 2,6	Aumenta	170,0+ 5,0	119,9+ 5,8	49,1+21,9
844	130,0+ 0,1	137,7+ 3,3	8,2+ 9,9	80,6+ 7,7	35,1+ 4,4	0
845	130,0+ 0,1	140,0+ 2,6	0	155,5+ 8,8	65,1+ 7,4	8,5+ 7,6
941	46,9+ 8,3	59,0+10,5	150,0+ 9,1	0	26,4+ 9,9	21,3+12,9
942	130,0+ 0,1	140,0+ 2,6	0	99,8+ 7,8	49,9+ 8,8	0
943	4,6+ 1,9	18,9+ 2,7	72,4+10,1	6,4+ 5,2	4,4+ 4,3	0
944	130,0+ 0,1	30,3+ 4,8	63,8+12,6	20,9+ 6,9	21,3+ 6,2	22,3+ 7,6

(1) Entre paréntesis se indica la concentración inicial de cada ácido.

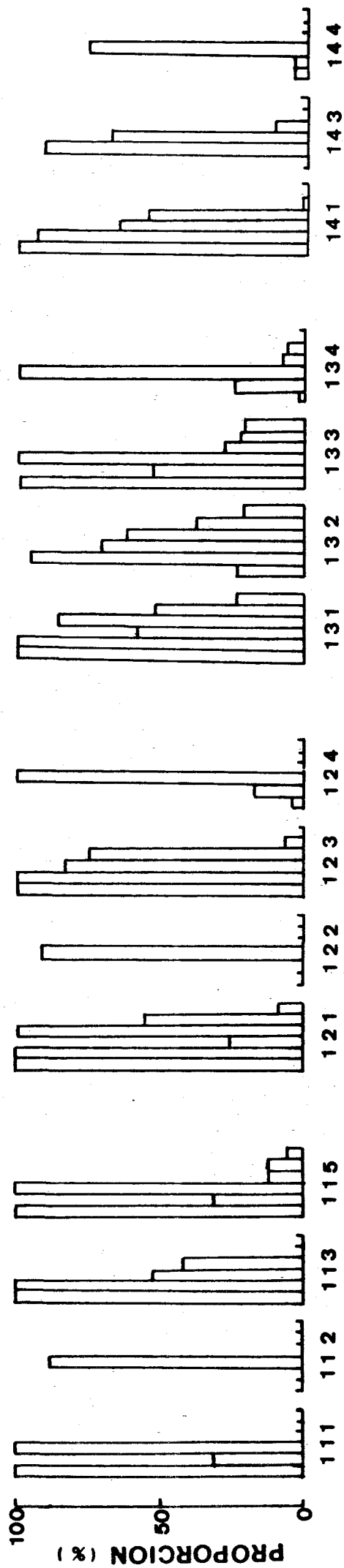


Figura 20. Proporción de los ácidos consumidos por las cepas procedentes de los cultivos de enriquecimiento ALN.

En los histogramas se representa de izquierda a derecha los ácidos: p-hidroxifenil acético, vanillico, cafeico, siríngico, verátrico y 3,4,5, trimetoxi benzoico.

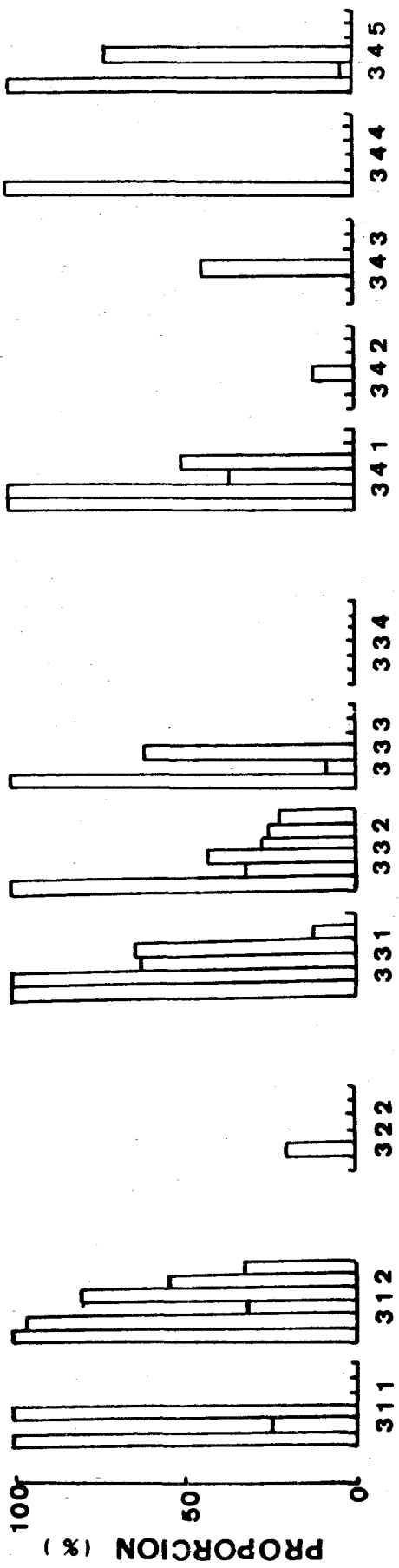


Figura 21. Proporción (%) de los ácidos consumidos por las cepas procedentes de los cultivos de enriquecimiento TBN. En los histogramas se representa a derecha los ácidos: p-hidroxifenil acético, vanílico, cafeico, sirínigico, verátrico y 3,4,5, trimetoxibenzoico.

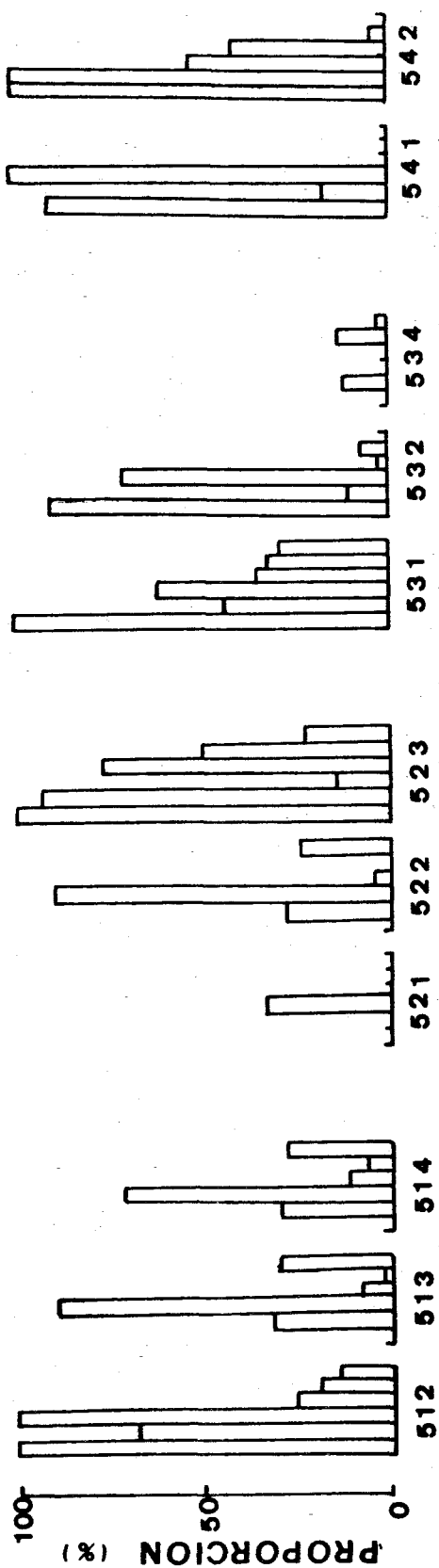


Figura 22. Proporción (%) de los ácidos consumidos por las cepas procedentes de los cultivos de enriquecimiento ACN. En los histogramas se representa de izquierda a derecha los ácidos: p-hidroxifenil acético, vanillico, cafeico, siríngico, verátrico y 3,4,5 trimetoxibenzoico.

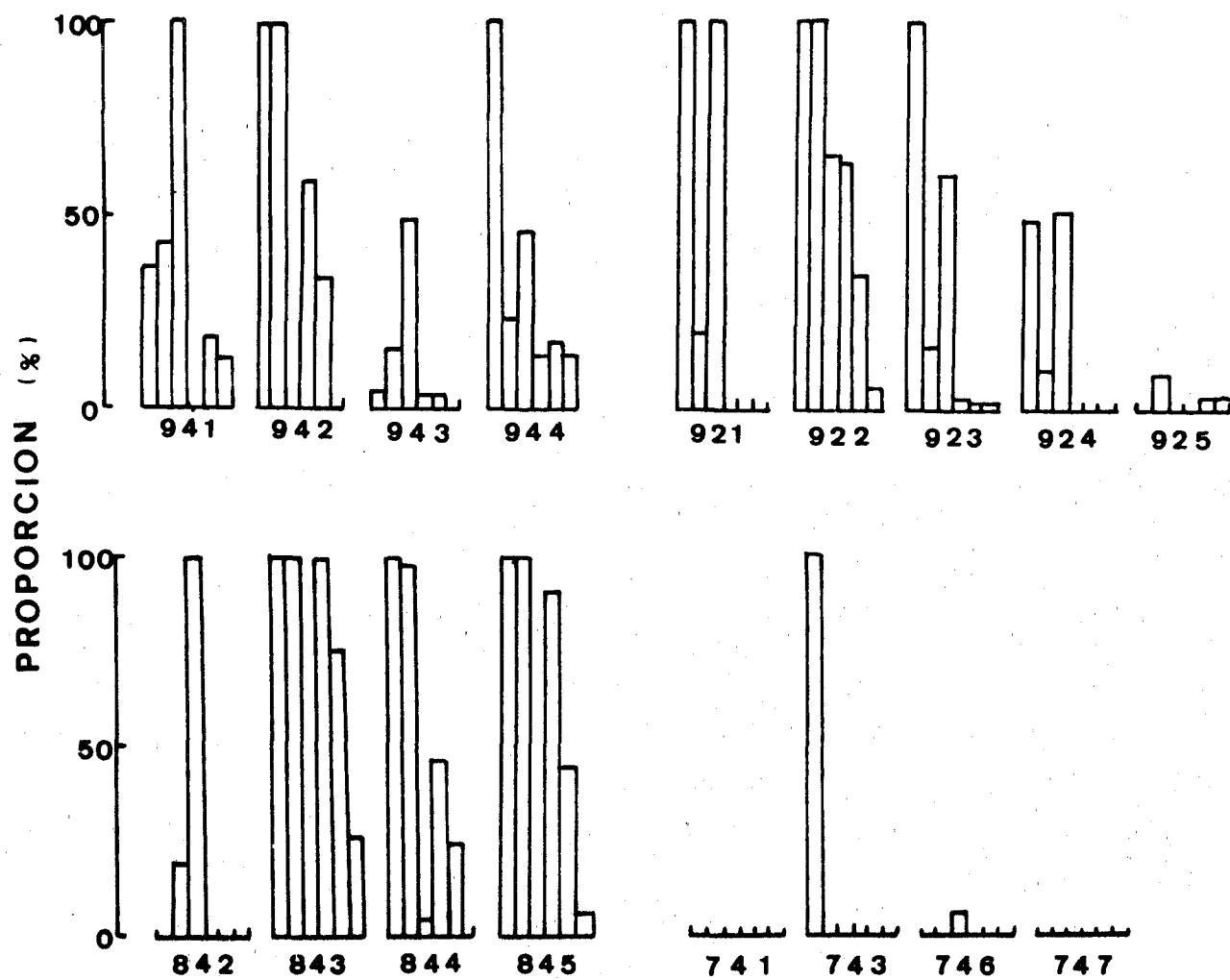


Figura 23. Proporción (%) de los ácidos consumidos por las cepas procedentes de los cultivos decolorados. En los histogramas se representa de izquierda a derecha los ácidos: p-hidroxifenil acético, vanílicico, cafeico, siríngico, verátrico y 3,4,5 trimetoxibenzoico.

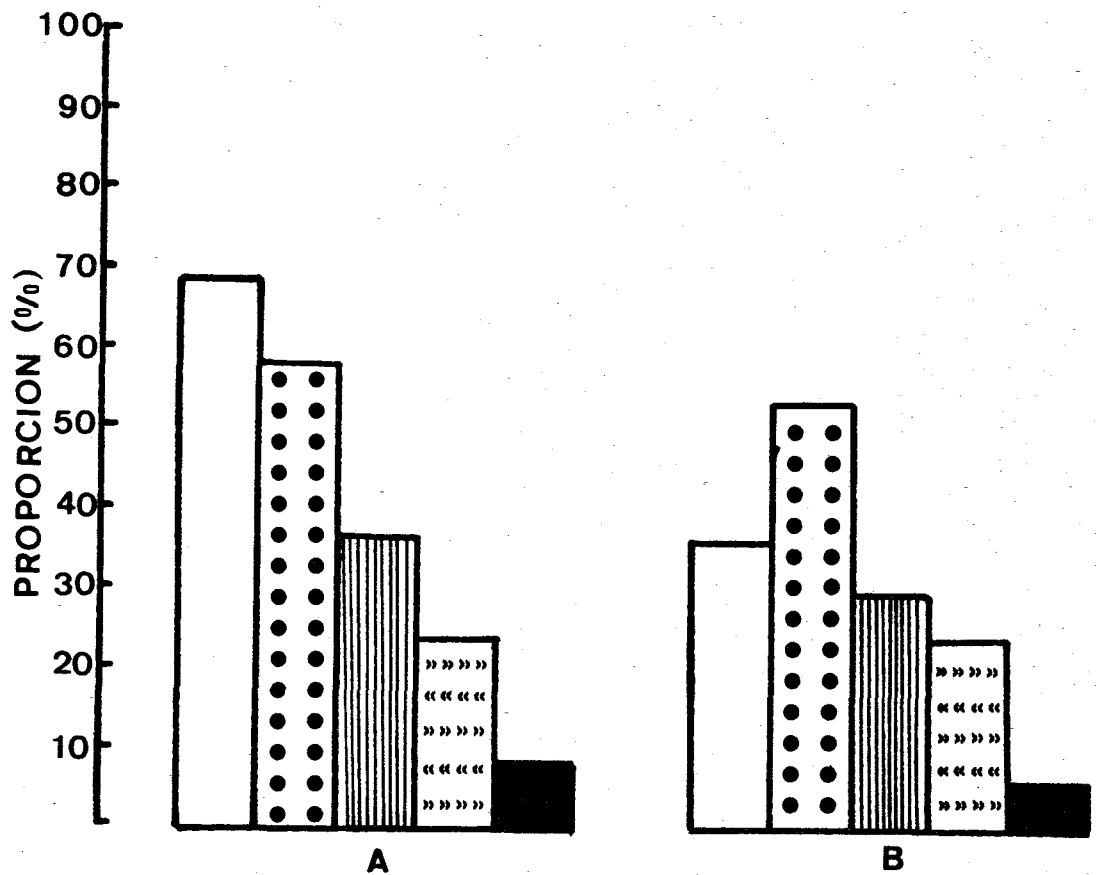







Figura 24. Proporción (%) de bacterias que consumen cada ácido en una cantidad superior al 50 %.

Acido cafeico:  ; Acido p-hidroxifenil acético:  ;
 Acido vanílico:  ; Acido siríngico:  ; Acido
 verátrico:  .

A: cepas procedentes del protocolo inicial de aislamiento.

B: cepas procedentes de los cultivos decolorados.

Tabla 18. Patrones de degradación de los ácidos y su distribución en los distintos grupos aislados;

Protocolo inicial	Numero de cepas Cultivos decolorados	ACIDO					GRUPO (1)					
		CAF	4FA	VAN	SIR	VER	a	b	c	d	e	f
6	5	-	-	-	-	-	11	4	2	4	1	0
2	2	-	+	-	-	-	4	2	2	0	0	0
8	3	+	-	-	-	-	11	10	1	0	0	0
8	2	+	+	-	-	-	10	5	4	0	1	0
1	0	+	-	+	-	-	1	0	1	0	0	0
0	1	-	+	+	-	-	1	1	0	0	0	0
4	0	+	+	+	-	-	4	3	1	0	0	0
1	2	-	+	+	+	-	3	3	0	0	0	0
1	0	+	-	+	+	-	1	0	0	0	1	0
3	1	+	+	+	+	-	4	3	1	0	0	0
3	0	-	+	+	+	+	3	2	0	0	0	1
0	1	A*	+	+	+	+	1	1	0	0	0	0
1	0	+	+	+	+	+	1	1	0	0	0	0

+; cantidad residual inferior al 50% de la inicial

-; cantidad residual superior al 50% de la inicial

(1) a; número total de cepas que presentan cada patrón de degradación, b; número de *Pseudomonas*, c; número de corineformes, d; número de *Bacillus*, e; número de *Vibrionaceae*, f; número de *Enterobacteriaceae*.

*; El perfil cromatográfico obtenido proporciona valores de ácido cafeico muy superiores a los iniciales.

Doce cepas degradan a la vez dos ácidos. Sólo una de ellas consume 4-hidroxifenil acético y vanílicico, sin embargo son 10 las que utilizan 4-hidroxifenil acético y cafeico.

Ocho bacterias disminuyen el contenido de 3 de los 6 ácidos con las distintas combinaciones que aparecen en la tabla 18, entre las que la degradación de cafeico, vanílicico y siríngico solamente se ha detectado una cepa.

Un total de 8 cepas degradan 4 ácidos fenólicos. Todas ellas utilizan el 4 hidroxifenil acético, vanílicico y siríngico, sin embargo 4 consumen cafeico y otras 4 verátrico como cuarto ácido. De estas 8 cepas, 6 se han caracterizado como *Pseudomonas*.

También pertenecen al grupo *Pseudomonas* la única cepa capaz de consumir 5 de los 6 ácidos utilizados.

En las tablas 19 y 20 se indican los distintos perfiles de degradación en los diferentes grupos taxonómicos. Destaca dentro de los *Pseudomonas* que las bacterias que consumen más de dos ácidos fenólicos pertenecen a dos grupos fisiológicos: P₁ y P₆. Las corineformes, con excepción de una cepa no consumen siríngico ni verátrico.

El 100 % de *Bacillus* son incapaces de consumir ninguno de los 6 ácidos fenólicos.

Al hacer la proporción de bacterias de cada uno de los 4 muestreos (15, 30, 60 y 90 días) que consumen los distintos ácidos no se observan grandes diferencias. Sin embargo sí se aprecia un menor consumo de todos los ácidos, excepto el siríngico, en las cepas de los matraces decolorados (Figura 39).

En la figura 40 aparecen las proporciones de cepas procedentes de los 3 cultivos de enriquecimiento que consumen cada uno de los ácidos. Se puede observar que las cepas procedentes de los cultivos ALN son las que degradan en mayor proporción los cinco ácidos.

Tabla 19. Tipos de patrones de degradación de ácidos en el grupo de *Pseudomonas*

Nº de cepas	ACIDO					
	4FA	VAN	CAF	SIR	VER	TMB
<i>Pseudomonas</i> P ₁						
1	-	-	+	-	-	-
1	+	-	+	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-
2	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	+	-
1	+	+	+	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> P ₂						
1	+	-	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-
1	+	+	A	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> P ₃						
6	-	-	+	-	-	-
1	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> P ₄						
2	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
1	+	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> P ₅						
1	+	-	-	-	-	-
1	+	+	-	+	-	-
2	+	+	+	+	-	-
1	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> P ₆						
2	-	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-

Tabla 20. Tipos de patrones de degradación de ácidos en el grupo de bacterias corineformes.

Nº de cepas	ACIDO					
	4FA	VAN	CAF	SIR	VER	TMB
Corineformes						
2	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-
1	-	+	+	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-
1	+	+	+	-	-	-
1	+	+	+	+	-	-

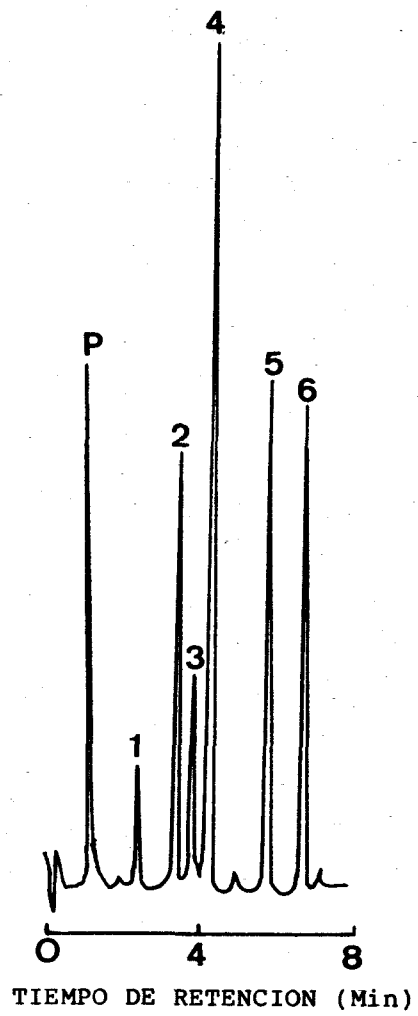


Figura 25. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos del medio de cultivo no inoculado.

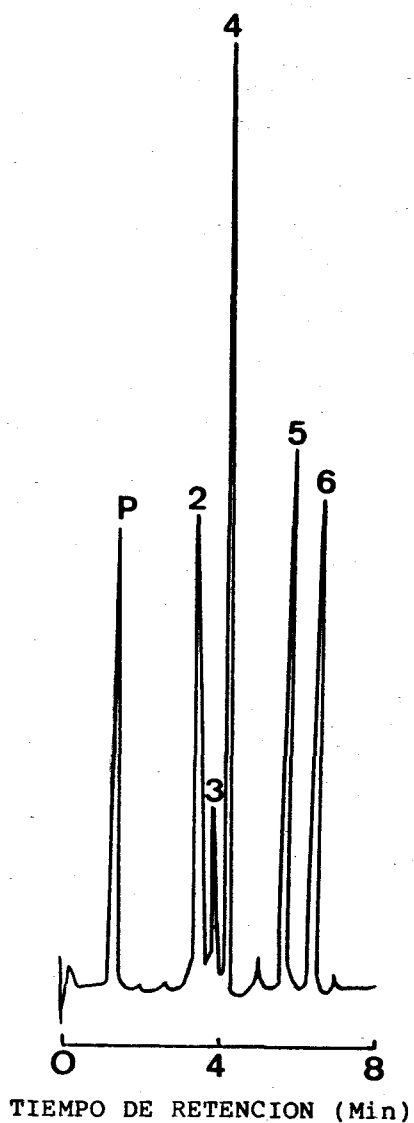


Figura 26. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume ácido p-hidroxifenil acético.

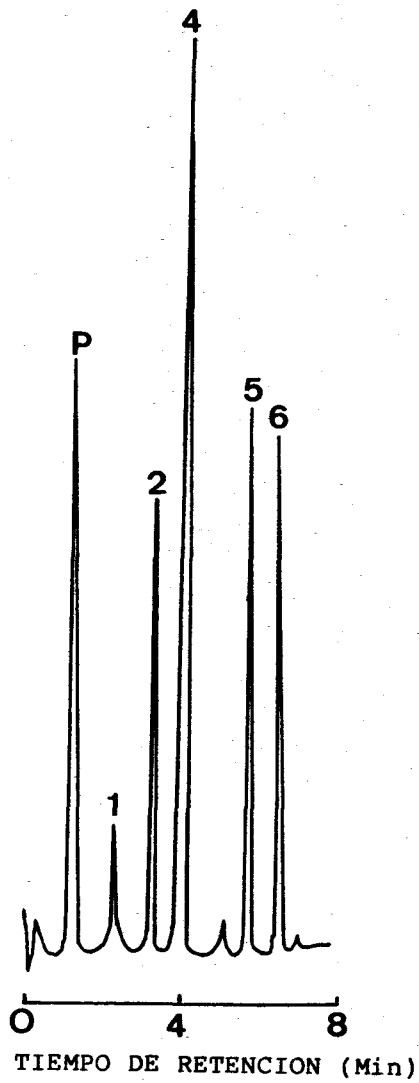


Figura 27. Perfil cromatográfico de los extractos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume ácido cafeico.

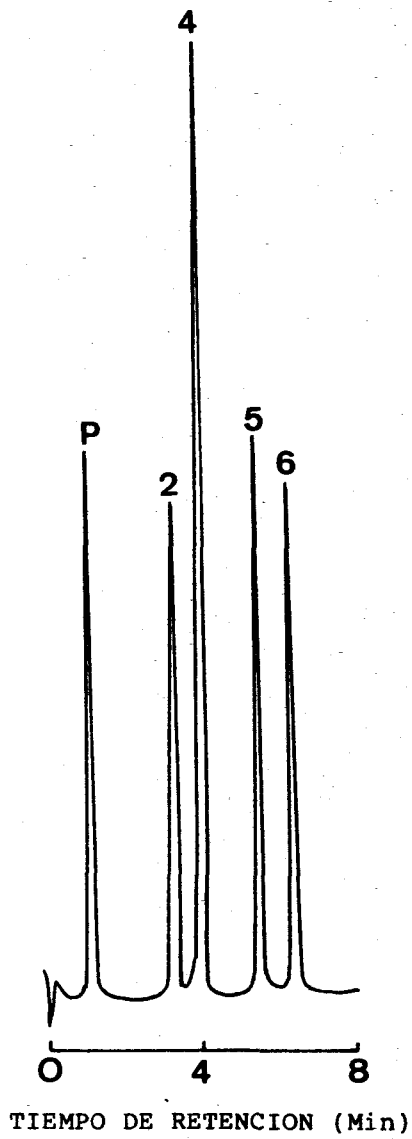


Figura 28. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético y cafeico.

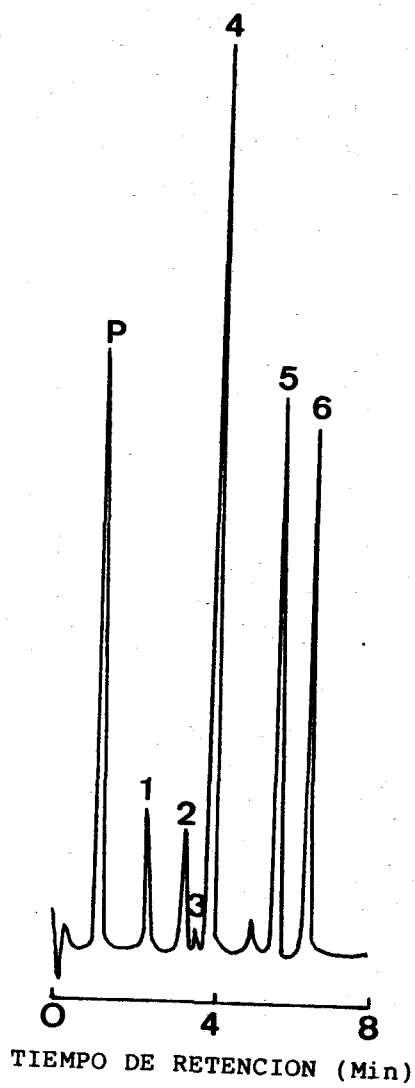


Figura 29. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos vanílicico y cafeico.

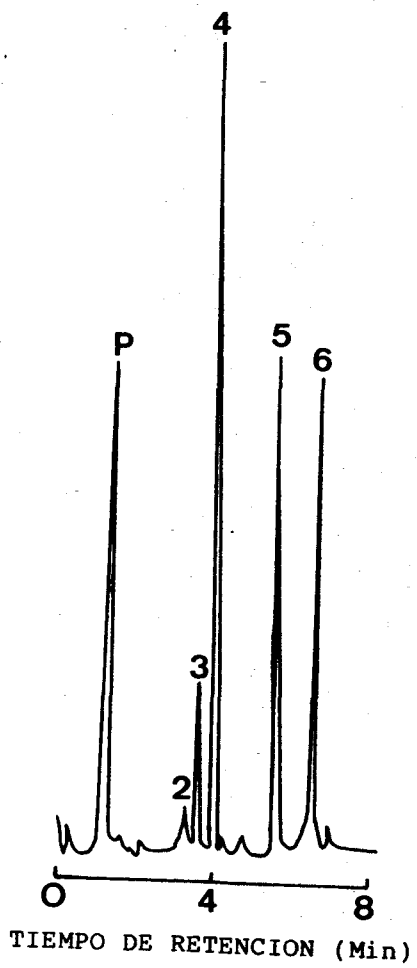


Figura 30. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético y vanílico.

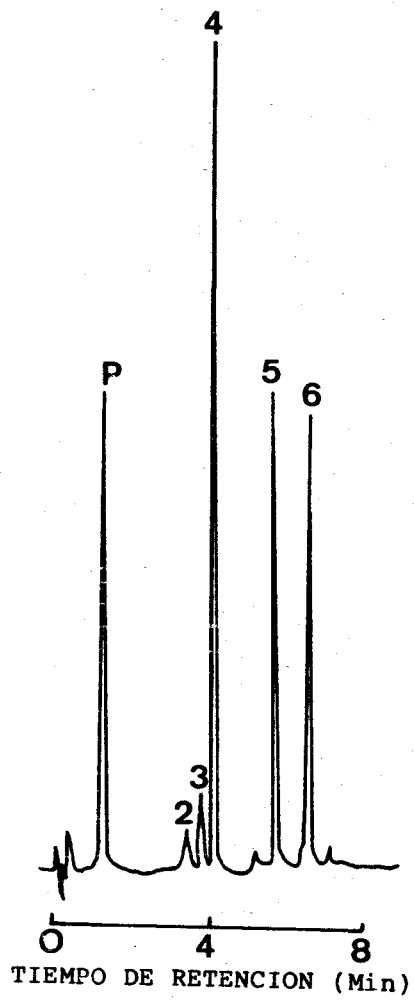


Figura 31. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanílico y cafeico.

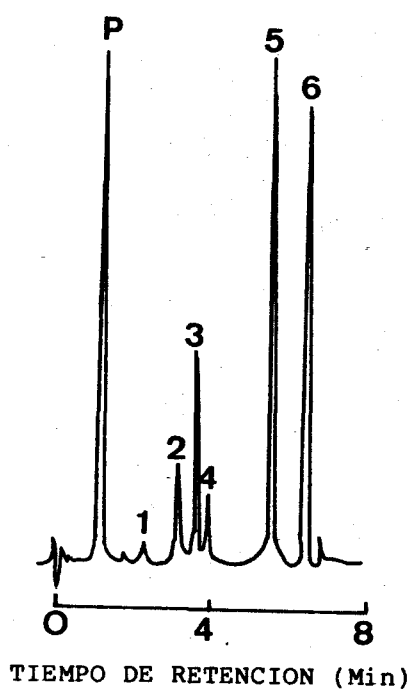


Figura 32. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanílicico y siríngico.

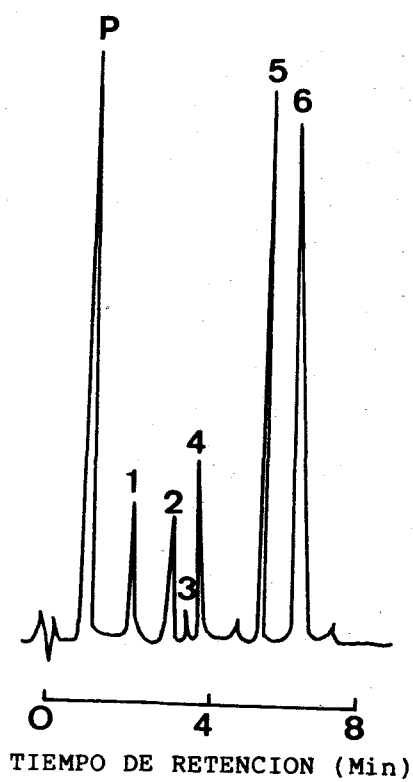


Figura 33. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos vanílicico, cafeico, siríngico.

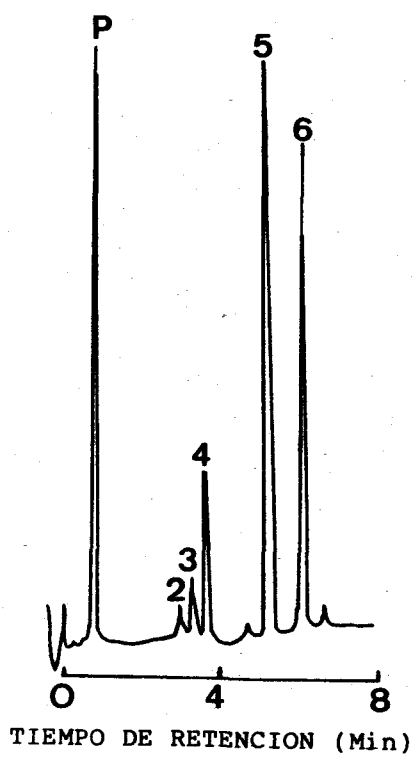


Figura 34. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanílicico, cafeico y siríngico.

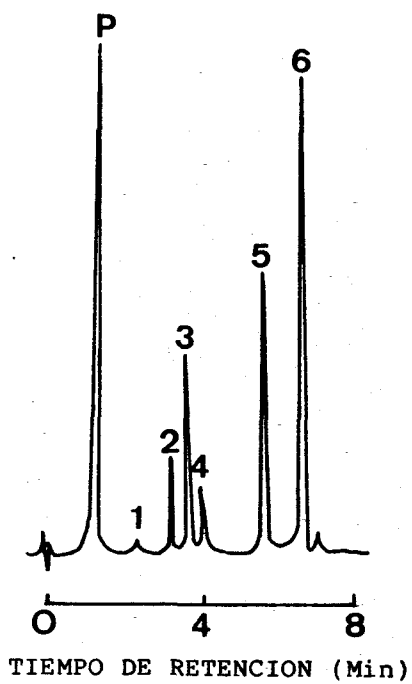


Figura 35. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanílico, siríngico y verátrico.

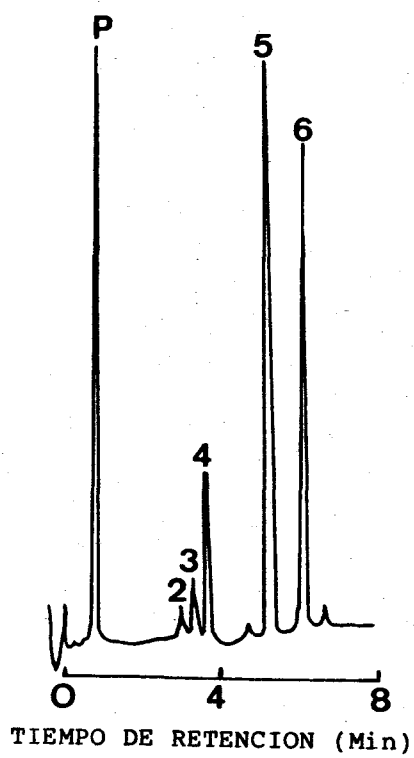


Figura 34. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanílico, cafeico y siríngico.

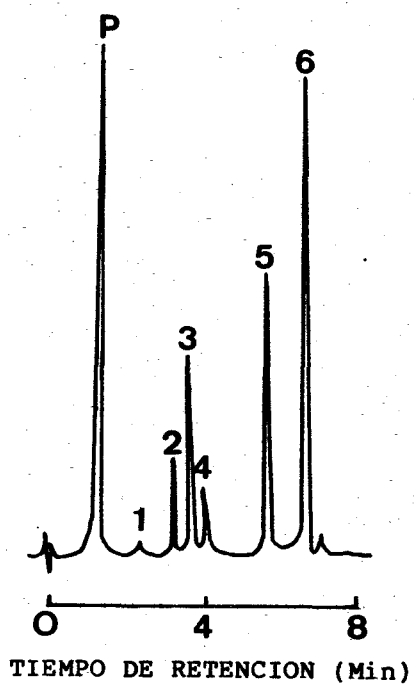


Figura 35. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanillico, siríngico y verátrico.

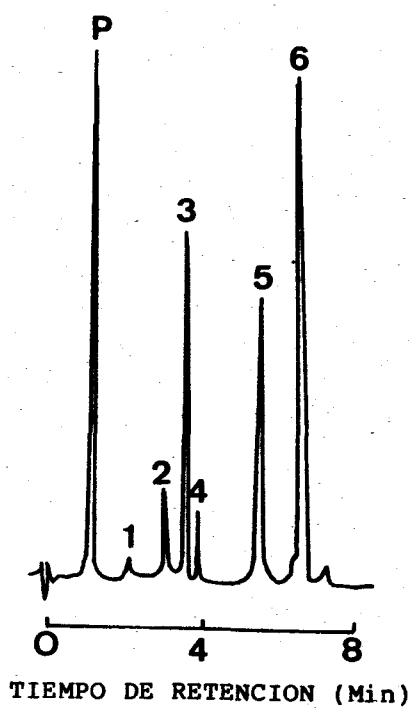


Figura 36. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanillico, siríngico y verátrico. Aparece aumentado el ácido cafeico.

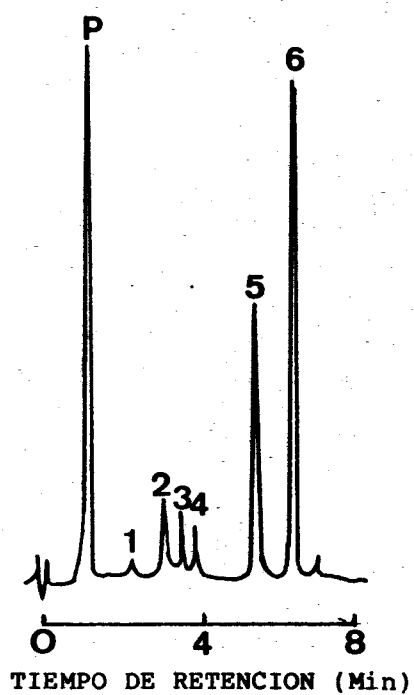
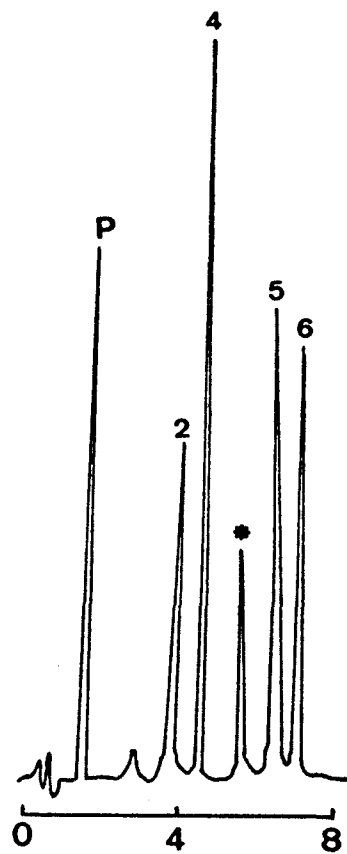
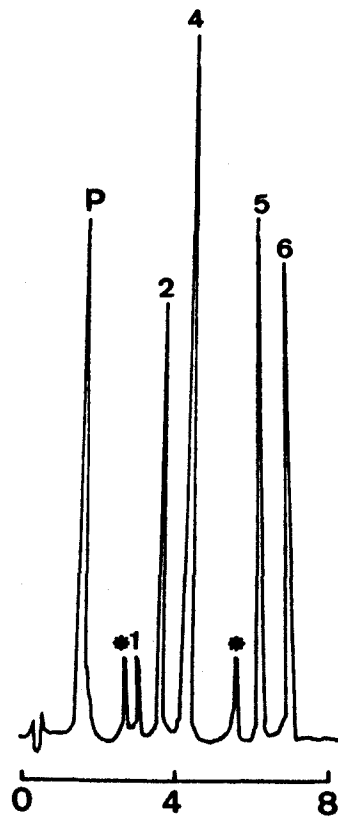


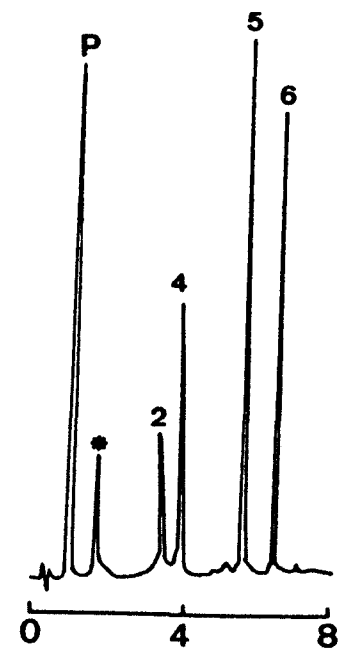
Figura 37. Perfil cromatográfico de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa que consume los ácidos p-hidroxifenil acético, vanílicico, cafeico, siríngico y verátrico.



115



134



331

Figura 38. Perfil cromatográfico obtenido por CLAE de los extractos etéreos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos de dos *Pseudomonas* (134 y 331) y una bacteria corineforme (115).

* : picos aparecidos como consecuencia de la transformación de los componentes de la mezcla.

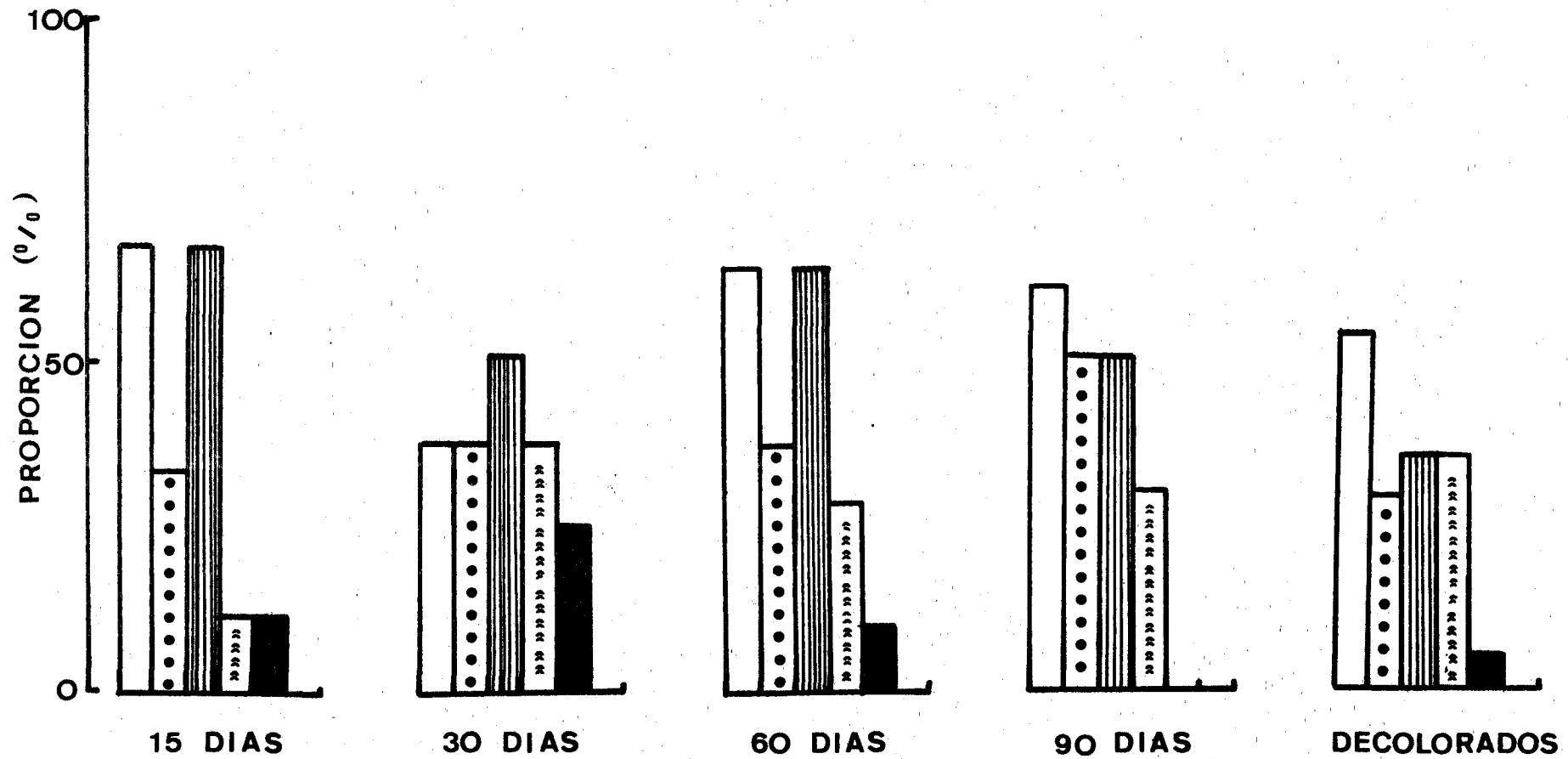


Figura 39. Proporción (%) total de cepas que consumen cada ácido fenólico.

Acido p-hidroxifenil acético: ; Acido vanillico: ; Acido cafeico: ;
 Acio siríngico: ; Acido verátrico: .

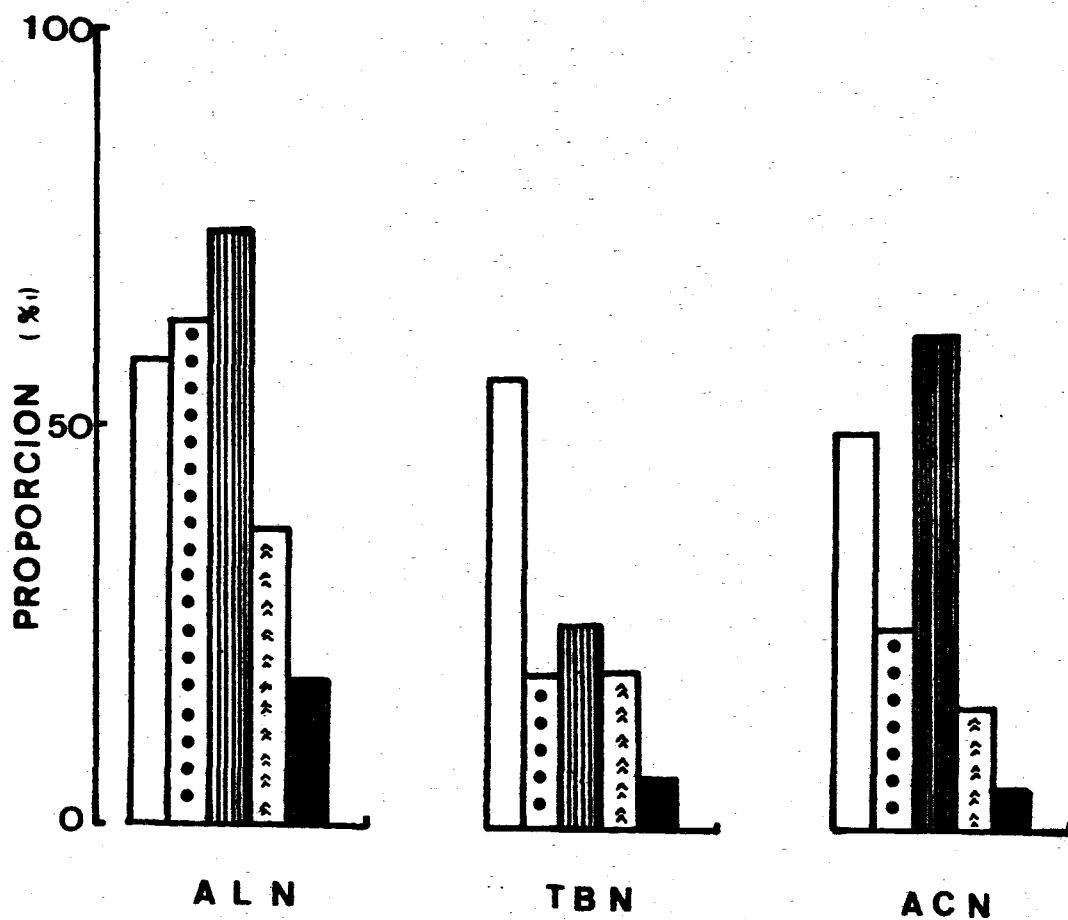


Figura 40. Proporción (%) de cepas de los tres cultivos de enriquecimiento que consumen cada uno de los ácidos.

Acido p-hidroxifenil acético: ; Acido vanillico: ;
 Acido cafeico: ; Acido siríngico:
 Acido verátrico: .

III.2. DEL POLIMERO

III.2.1. EN LOS CULTIVOS DE ENRIQUECIMIENTO

Como ya se ha indicado anteriormente, al no observar modificaciones apreciables de coloración en los cultivos sometidos al protocolo inicial de aislamiento, una vez realizados las resiembras o aislamientos, tales cultivos se siguieron incubando hasta que fuese posible la detección de decoloración. Esta se observó en la segunda resiembra de los cultivos procedentes del enriquecimiento primario ACN incubados durante 90 días.

III.2.1.1. Decoloración en los cultivos ACN incubados durante 30 días

Los matraces de la segunda resiembra de los cultivos ACN-30 tras haber permanecido 15 días en reposo según el protocolo inicial y tras haber observado cierta decoloración frente a su control, se mantuvieron 90 días en agitación a 28°C. Transcurridos 60 días se observó la decoloración a simple vista de los cultivos (ACN-30) frente a su control. Para investigar el tipo de microorganismos capaces de provocar tal decoloración se procedió al aislamiento de la flora en el mismo medio adicionado de agar. Se aislaron un total de 5 cepas (921, 922, 923, 924 y 925).

Estos cultivos se resembraron a los 90 días (al 10%) en el mismo medio y se llevaron a incubar en agitación a 28°C. Tras 60 días, de incubación se apreció su decoloración aunque en menor grado que en los matraces iniciales.

ANALISIS POR CLAE Y CAPA FINA DE LOS SOBRENADANTES DE LOS CULTIVOS

Los sobrenadantes de los cultivos ACN-30 y su control ACE obtenidos por centrifugación se sometieron a análisis por CLAE y capa fina.

a) Análisis por CLAE

Las muestras (2 ml) se diluyeron en 10 ml de agua destilada y se extrajeron con éter según se indica en el apartado II.2 de material y métodos. Las fases orgánicas se desecaron, se redisolviéron en 0,5 ml de MeOH/H₂O (1:1) y se analizaron por CLAE (apartado II.3.1 y II.3.2 de material y métodos).

La figura 41 representa el cromatograma de los cultivos ACN-30, mientras que la figura 42 se corresponde con el perfil de los controles ACE-30.

Como era de esperar en estos controles aparece un cromatograma prácticamente plano debido a la ausencia de compuestos aromáticos libres. Sin embargo en el cromatograma de los cultivos ACN-30 aparecen varios picos correspondientes a compuestos aromáticos posiblemente liberados en la degradación del pigmento, responsable de la decoloración.

Cuatro de los picos han sido caracterizados como ácido gálico, ácido protocatéquico, catequina y epicatequina, no sólo por el tiempo de retención sino también por el cociente entre los factores de respuesta a 280 nm y 254 nm.

Las resiembras de estos cultivos fueron sometidos al mismo tipo de extracción y análisis. Sin embargo en los respectivos extractos etéreos no se detectaron fenoles libres (Figura 43), a pesar de observarse decolorados a simple vista.

Con objeto de intentar encontrar diferencias en la estructura interna del polímero entre los cultivos decolorados y sus respectivos controles, alícuotas de los mismos se sometieron a oxidación con óxido de cobre.

Tanto los cultivos como su control (Figura 44 y 45) presentan prácticamente los mismos picos aunque aparecen en general más disminuidos en los extractos de los cultivos que en los de sus controles. Si comparamos estos cromatogramas con los obtenidos para los extractos del pigmento oxidado con óxido de cobre (Figura 7) observamos que los perfiles son muy similares si bien todos los picos son más grandes en este último caso ya que el análisis se realizó sobre un extracto más concentrado.

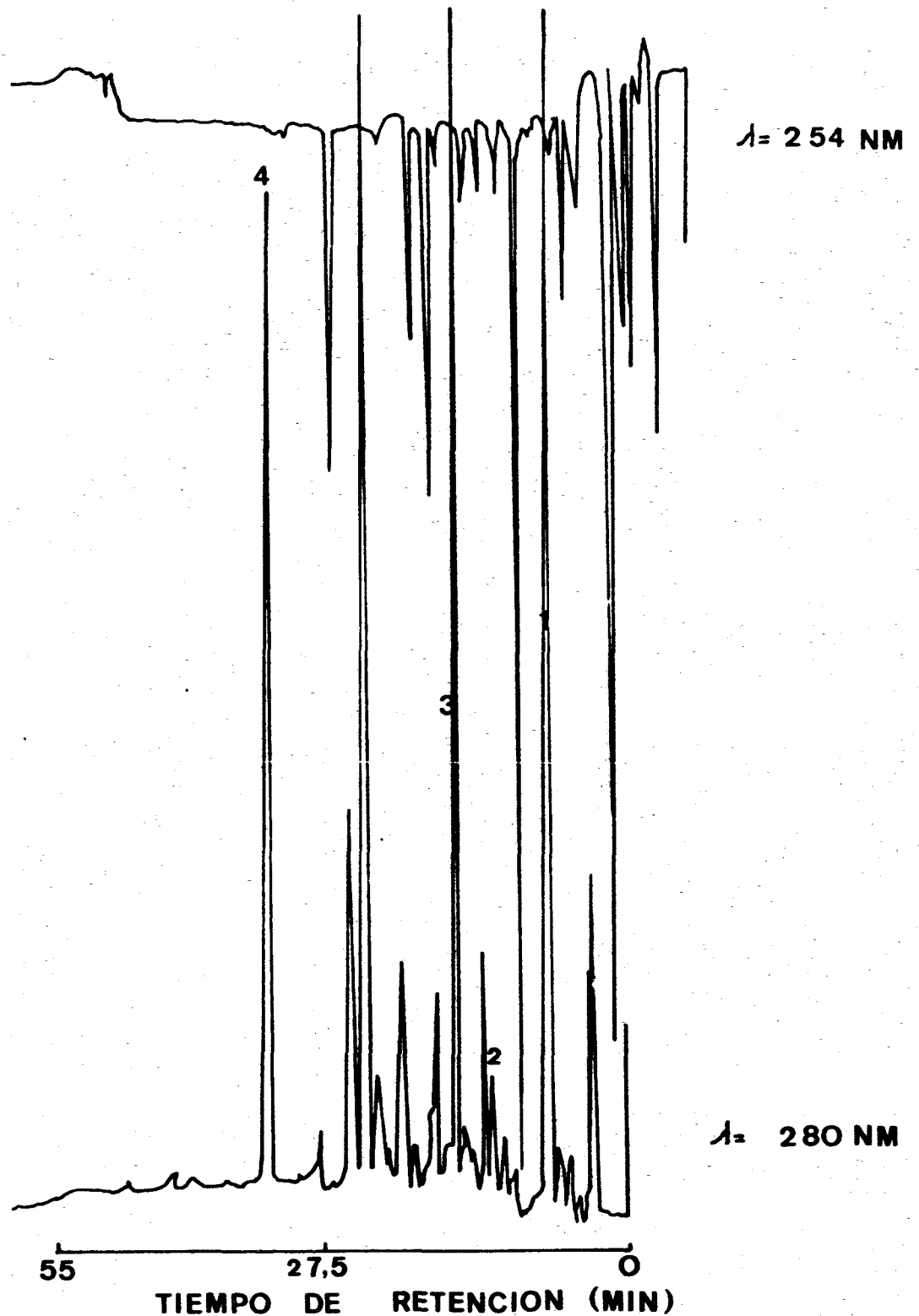


Figura 41. Cromatograma obtenido por CLAE de los extractos etéreos de los sobrenadantes de los cultivos ACN-30 decolorados.
1: Acido gálico; 2: Acido protocatéquico; 3: Catequina; 4: Epicatequina.

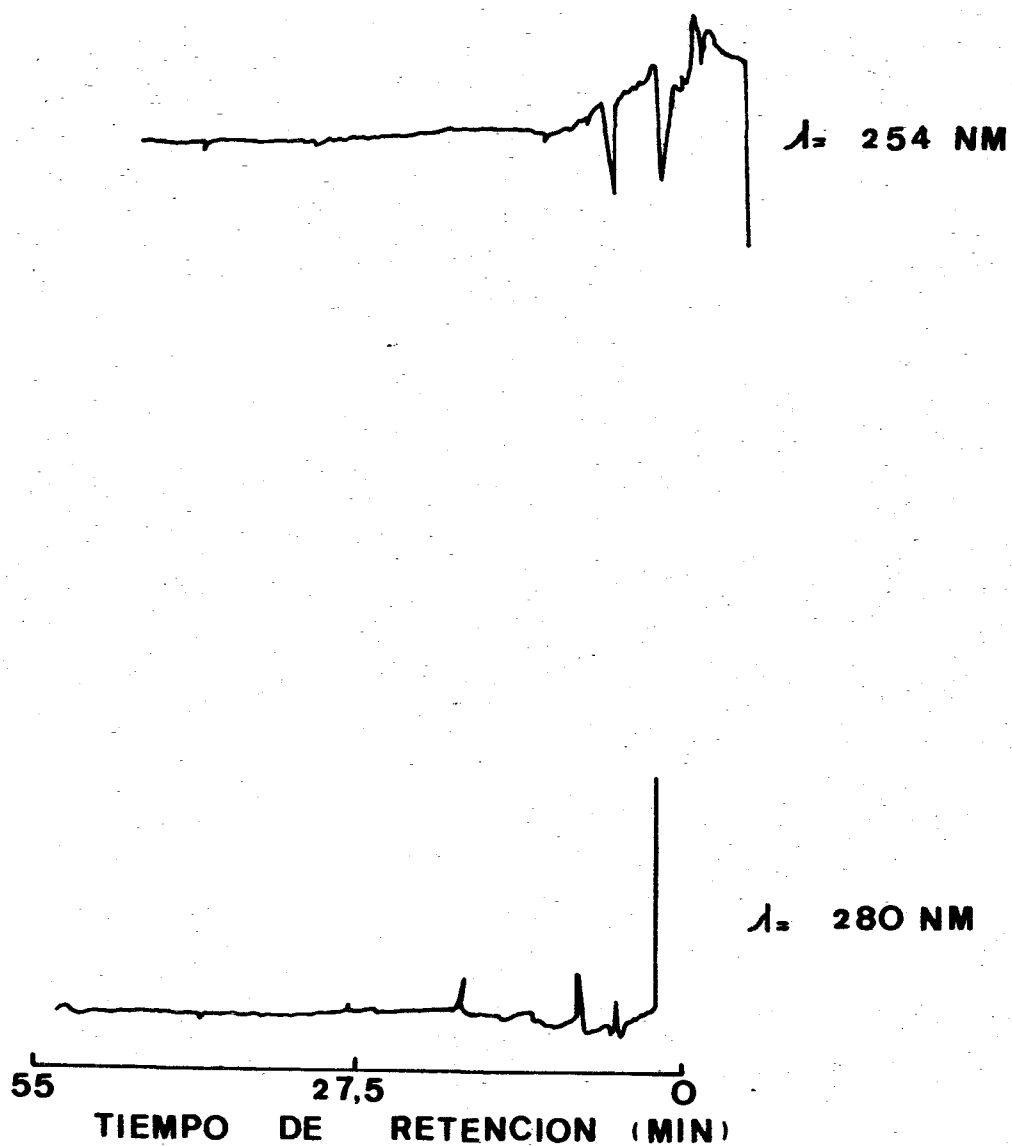


Figura 42: Cromatograma obtenido por CLAE de los extractos etéreos obtenidos de los sobranadantes de los controles ACE-30.

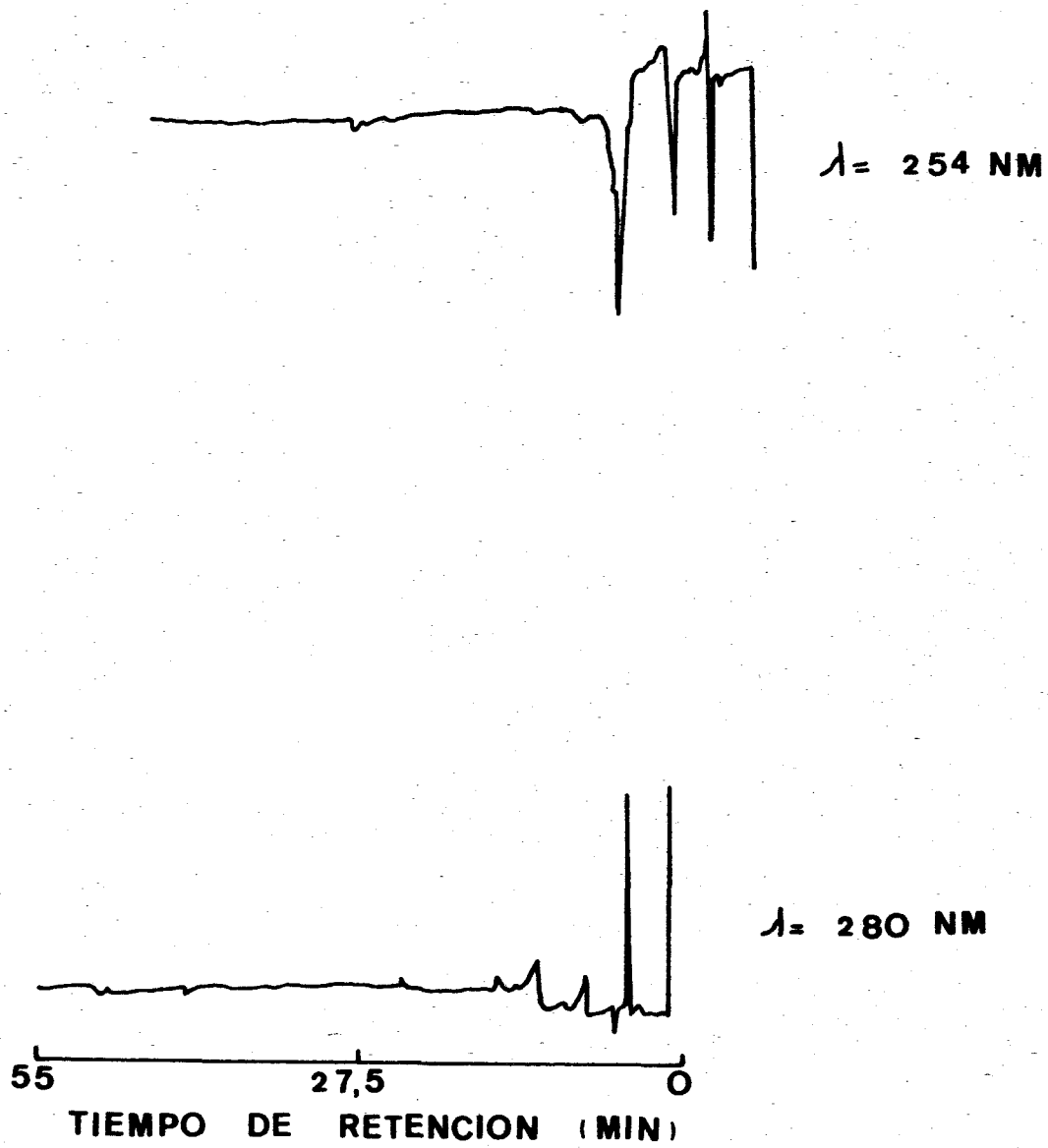


Figura 43. Cromatograma obtenido por CLAE de los extractos etéreos de las resiembras de los cultivos ACN-30.

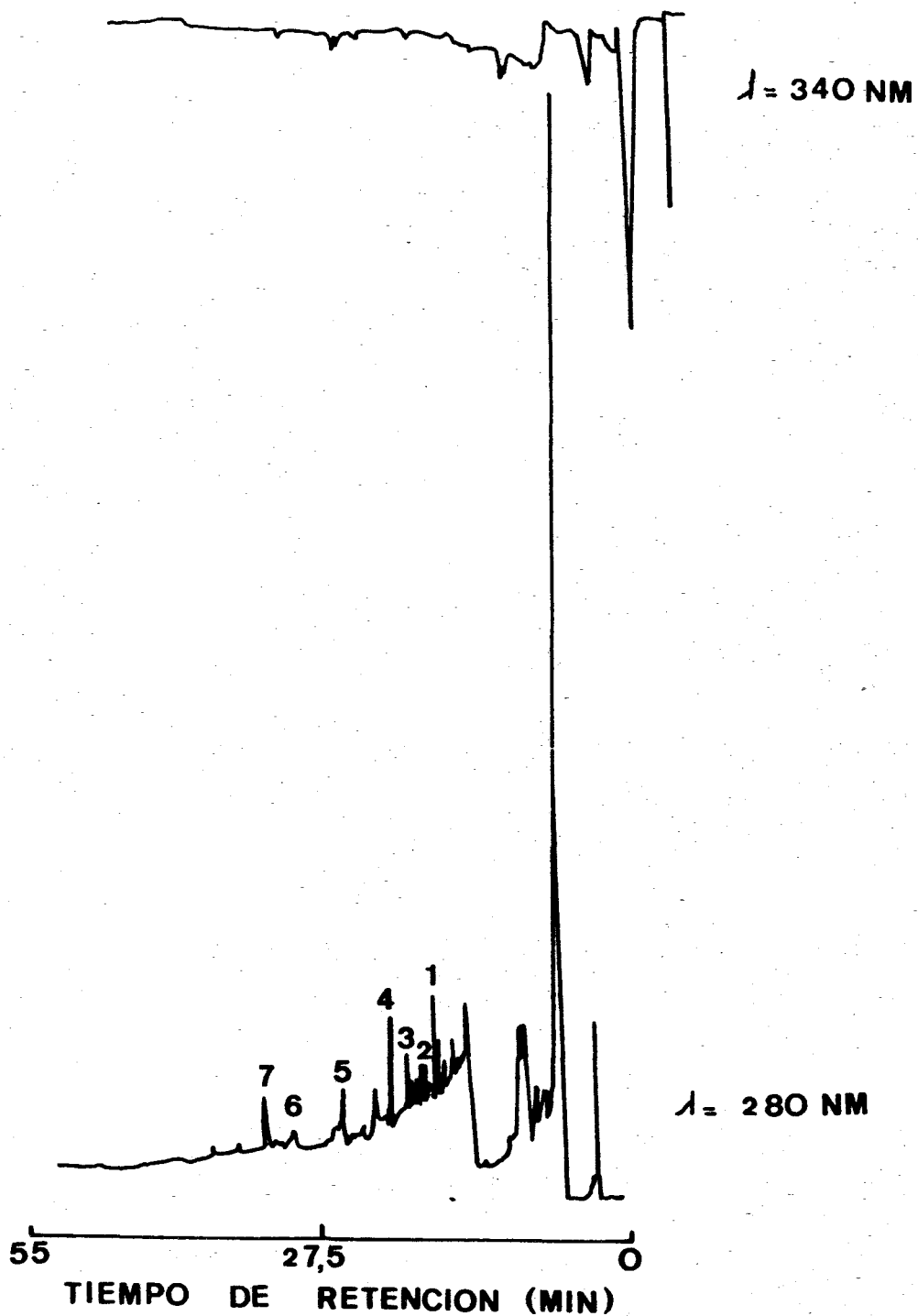


Figura 44. Cromatograma obtenido por CLAE de los extractos etéreos de los sobrenadantes de las resiembas de los cultivos ACN-30, tras tratamiento con óxido de cobre.

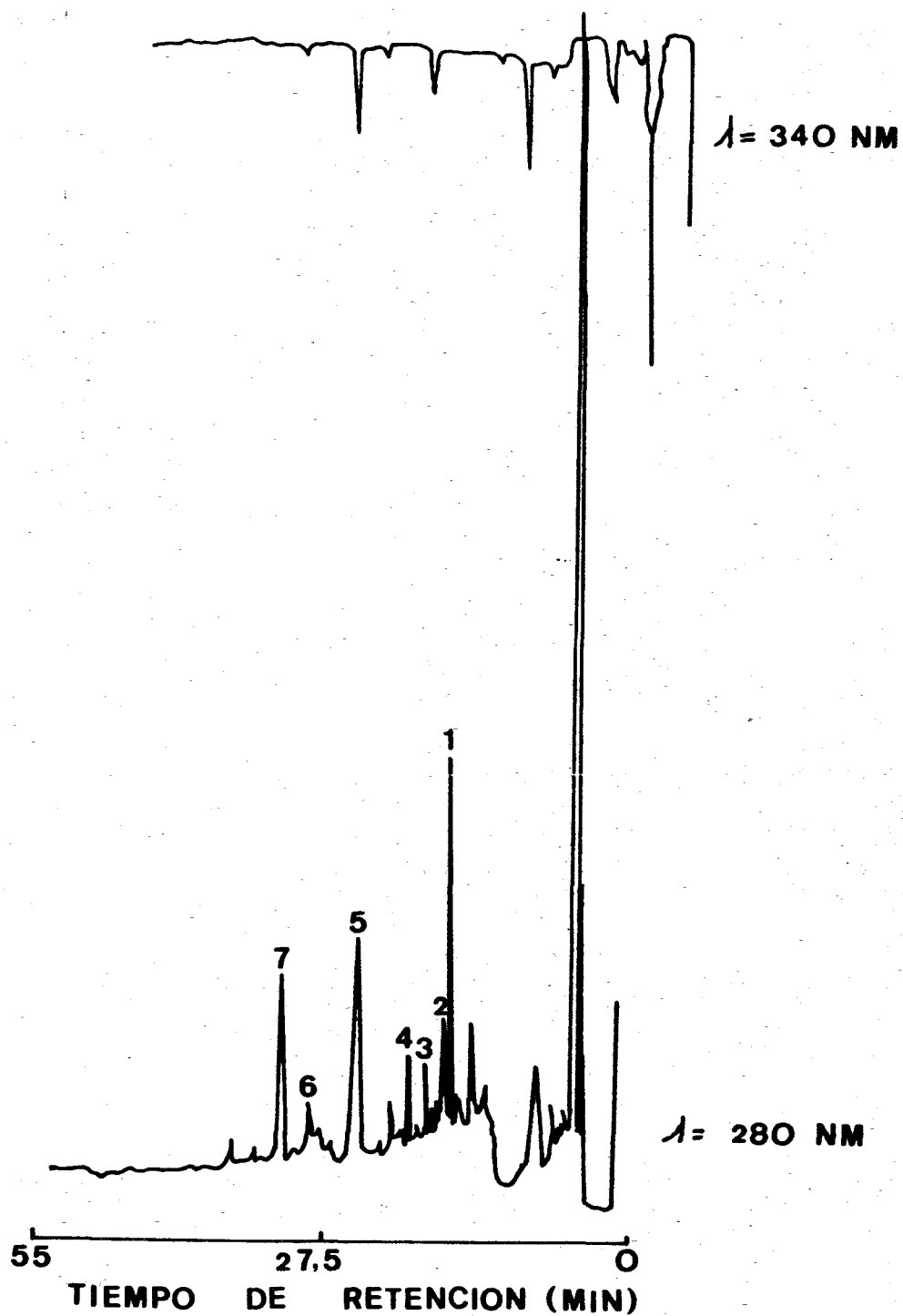


Figura 45. Cromatograma obtenido por CLAE de los extractos etéreos de los sobrenadantes de los controles de las resiembas de los cultivos ACE-30, tras tratamiento con óxido de cobre.

b) Análisis por cromatografía en capa fina

Con objeto de confirmar la caracterización de los compuestos detectados por CLAE, los extractos fueron sometidos a cromatografía en capa fina, según la metodología indicada en el apartado II.3.2 de material y métodos. Los resultados se muestran en las figuras 46 y 47.

III.2.1.2. Decoloración en los cultivos TBN-90, ACN-90 y ALN-90

Tras los 15 días de incubación que se aplicaron según el protocolo inicial, los cultivos procedentes de los enriquecimientos primarios fueron incubados en agitación a 28°C durante 90 días. Transcurrido este tiempo, se comprobó la decoloración de tales cultivos, independientemente de su origen.

Los sobrenadantes se sometieron al tratamiento descrito en la sección precedente pero en ningún caso se observó acumulación de compuestos aromáticos sencillos. Una vez decolorados de tales cultivos se realizaron aislamientos en el mismo medio de cultivo adicionado de agar, comprobándose después la pureza de la cepa en TSA. Se obtuvo la colección de 12 bacterias recogida en el apartado II de este capítulo.

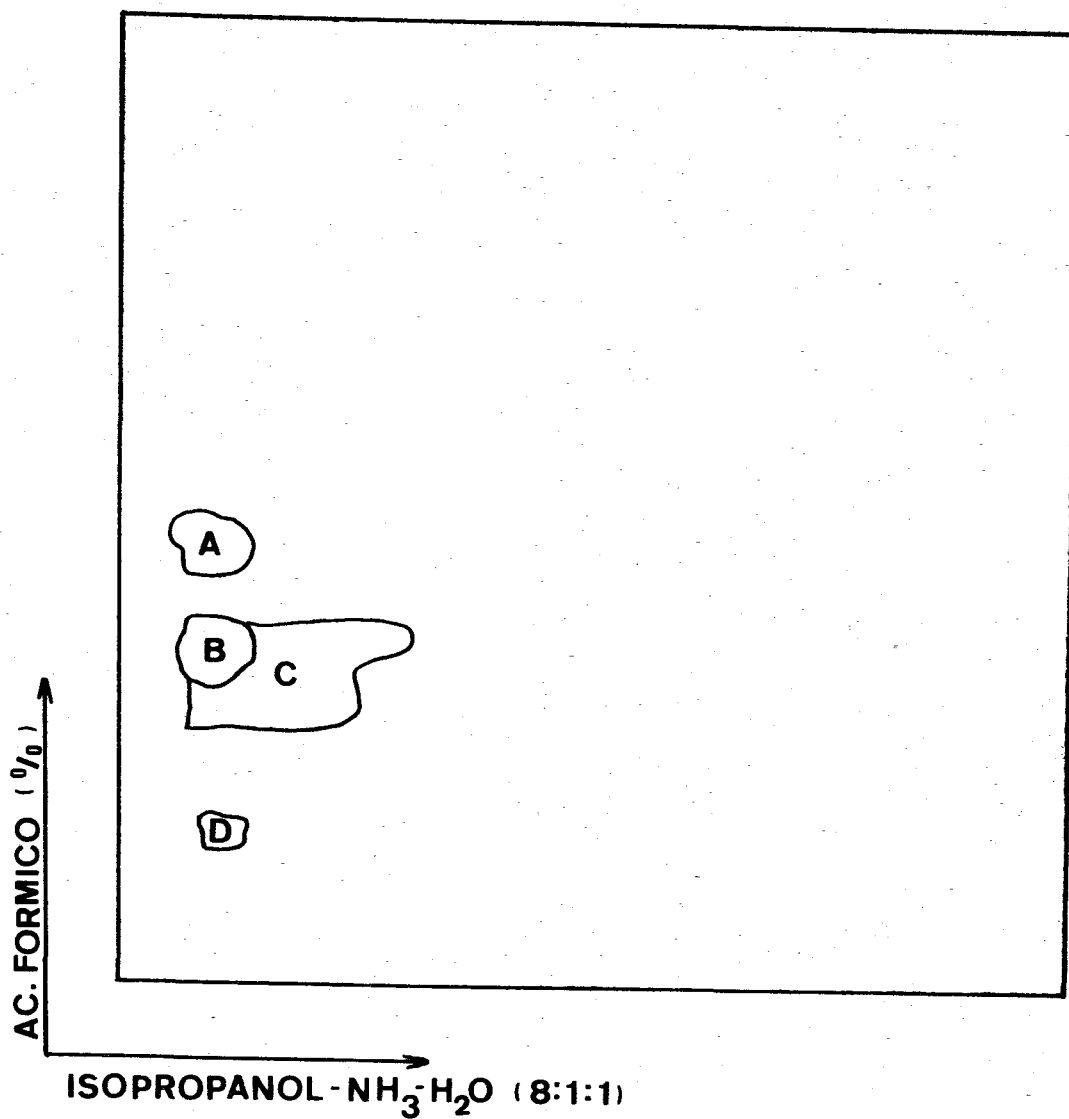


Figura 46: Cromatograma en capa fina de los extractos etéreos de los sobrenadantes de los cultivos decolorados ACN-30, tras el revelado con cloruro férrico y ferrocianuro.

A: Acido protocatéquico; B: Acido gálico; C: Catequina y epicatquina; D: Desconocida.

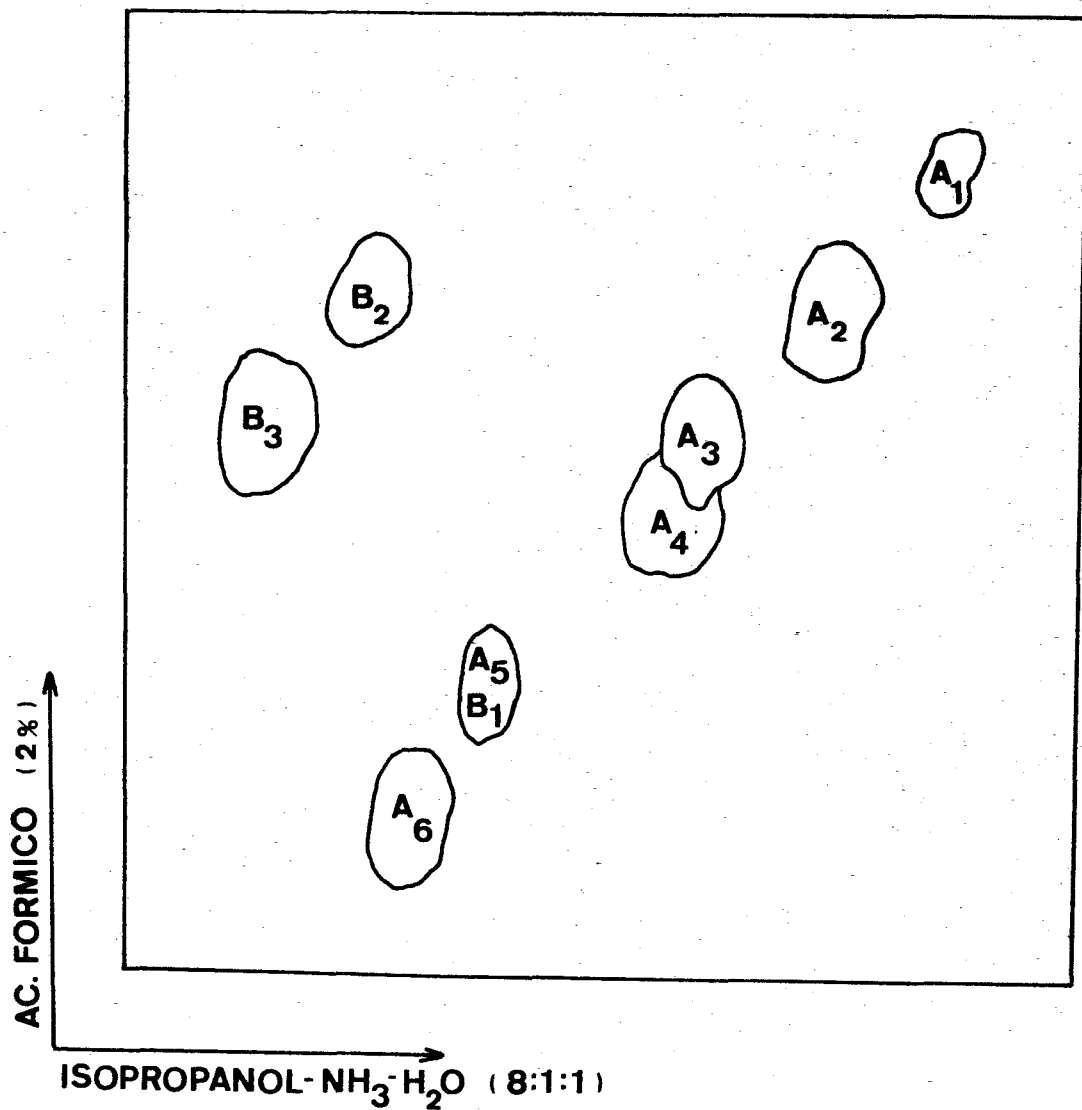


Figura 47. Cromatograma en capa fina de los sobrenadantes de los cultivos y controles de las resiembras de los cultivos ACN-30, tras tratamiento con óxido de cobre. A: Revelado con acetato y observado a 360 y 254 nm. B: Revelado con acetato sódico, p-nitroanilina y carbonato sódico. A₁: p-hidroxibenzaldehído; A₂: p-vanillina; A₃: Siringaldehído; A₄: Desconocido; A₅: Ácido p-cumárico; A₆: Ácido ferúlico; B₁: Ácido p-cumárico; B₂: Ácido vanillico; B₃: Ácido p-hidroxibenzoico.

III.2.2. POR *Phanerochaete chrysosporium* SC-26

A partir de cultivos mantenidos en agar-malta se inocularon alícuotas de 5 ml en la solución nutritiva descrita en el apartado III de material y métodos. Tras 48 horas de incubación los cultivos fueron transferidos a frascos Roux dispuestos con 120 ml del mismo medio adicionado de 0,36 ml de solución de pigmento.

Tras 35 días de incubación a 28°C fue detectada la decoloración a simple vista del medio de cultivo, por lo que la masa micelial se separó por filtración y en los sobrenadantes se procedió a la detección de compuestos aromáticos según metodología indicada en el apartado II.3. de material y métodos.

En la figura 48 se representa el cromatograma de los extractos etéreos de los cultivos con *Phanerochaete chrysosporium* SC-26. Se puede observar que se produce acumulación de compuestos aromáticos de pequeño peso molecular, entre los que se han identificado el p-hidroxibenzaldehído y los ácidos p-hidroxibenzoico y p-hidroxifenil propiónico.

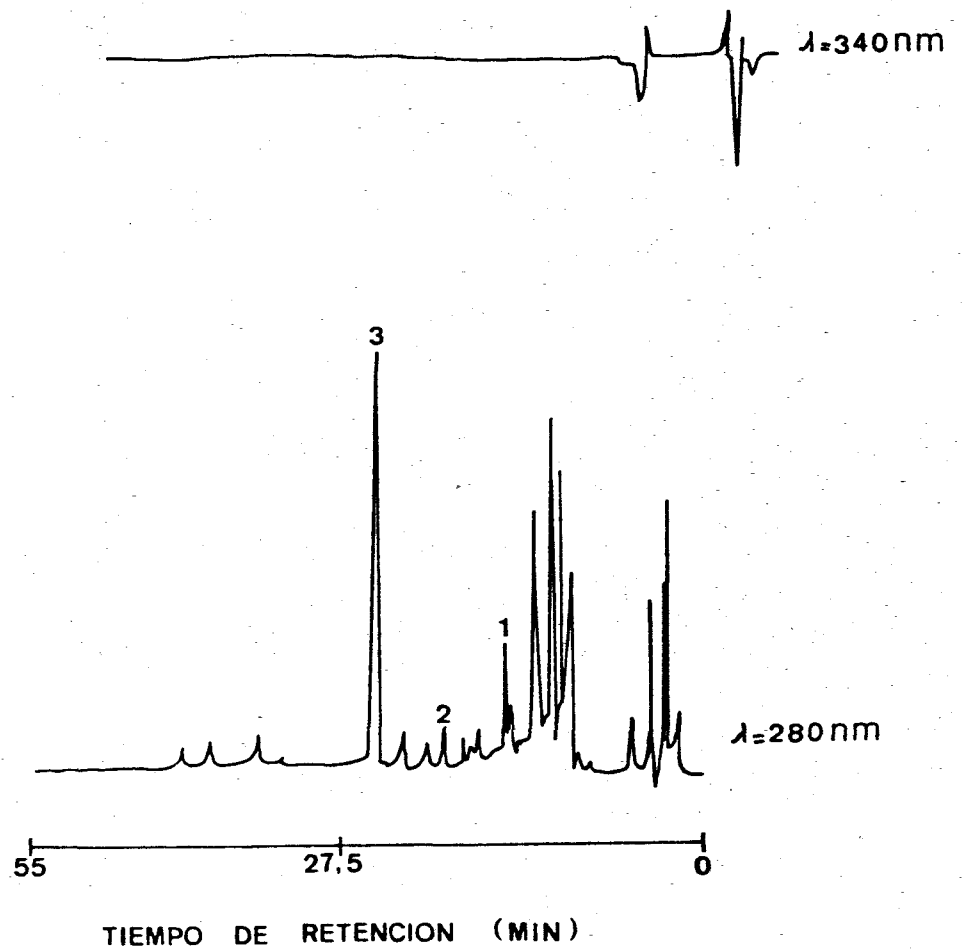


Figura 48. Cromatograma obtenido por CLAE de los filtrados de los cultivos de Phanerochaete chrysosporium SC-26.

III.2.3. PDR *Aspergillus terreus* Thom

Una vez identificado este hongo se inició el estudio de las modificaciones producidas en los medios de cultivo preparados con el pigmento del alpechín.

III.2.3.1. Cinética de crecimiento

Como medio de cultivo se utilizó el mismo que en su aislamiento, usando glucosa como fuente de carbono. En un primer experimento se dispusieron dos series de soluciones nutritivas; medio de cultivo y medio de cultivo adicionado de solución madre de pigmento, así como los respectivos controles de estas soluciones coloreadas.

Los medios de cultivo se repartieron en porciones de 50 ml y se inocularon al 1 % con la suspensión de esporas, determinándose el crecimiento por el peso seco. Los resultados se observan en la figura 49. Puede apreciarse que el pigmento no disminuye el crecimiento del microorganismo, más bien parece que lo aumenta, como parece confirmar el mayor consumo de glucosa en los cultivos adicionados de pigmento.

III.2.3.2. Consumo de glucosa

Se midió el consumo de glucosa por el hongo tanto en los cultivos solos como en los adicionados con pigmento. Como se puede apreciar en la figura 49 existe un mayor consumo de este azúcar en los cultivos con pigmento.

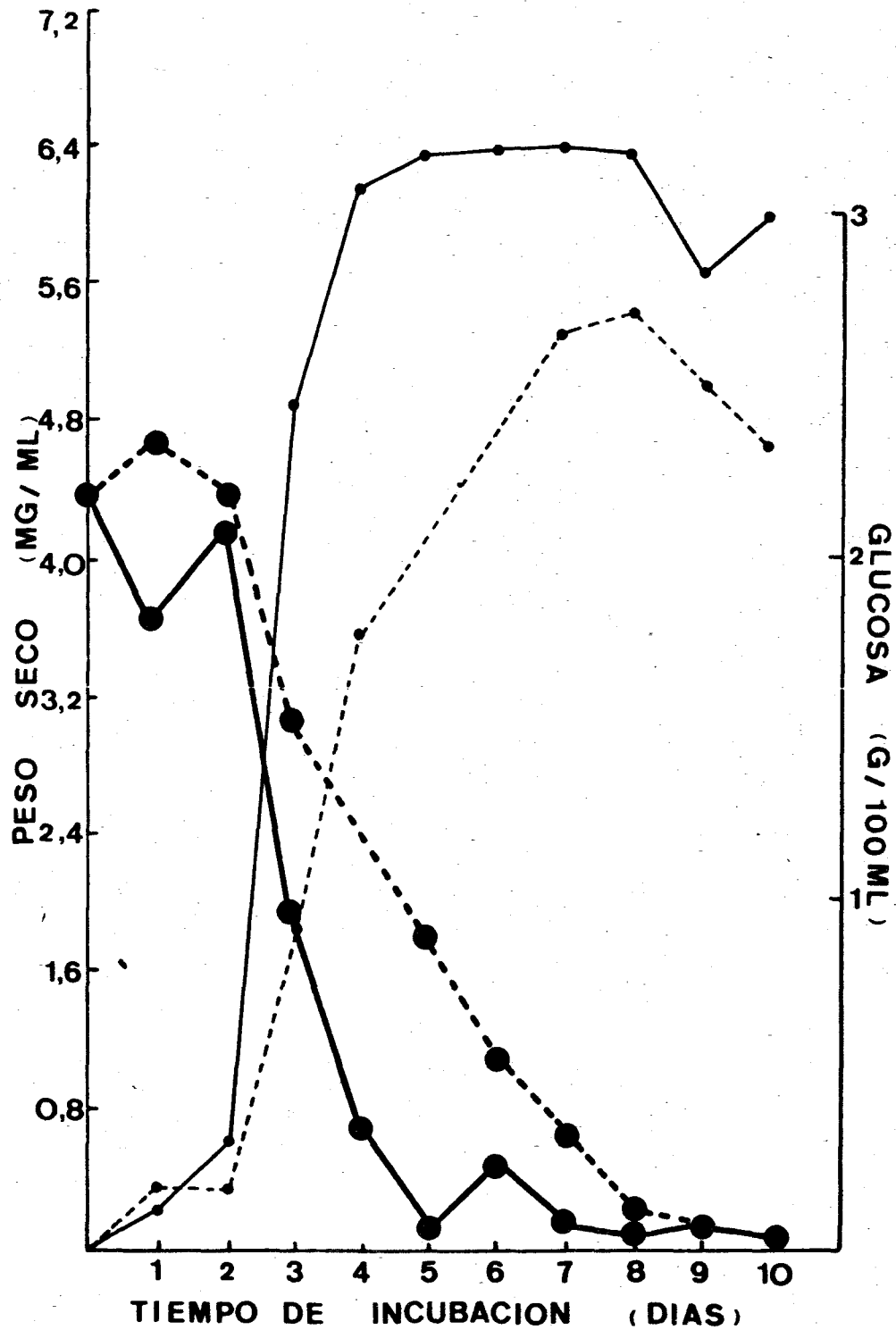


Figura 49: Crecimiento de *Aspergillus terreus* con glucosa y con glucosa más pigmento como fuente de carbono y consumo de glucosa por el microorganismo.

Peso seco con glucosa: - - - - - ; Peso seco con glucosa y pigmento: ———— ; Glucosa residual en los medios de cultivo con glucosa: ● - - - - ● ; Glucosa residual en los medios de cultivo con glucosa y pigmento: ● ———— ● .

III.2.3.3. Modificación de la absorbancia

En este estudio se utilizaron los filtrados obtenidos en la sección precedente. La figura 50 representa la evolución de la absorbancia de los filtrados de los cultivos. Se observa que a partir del 2º día la D.O. aumenta en presencia de pigmento, llegando a ser máxima a los 5 días de incubación, a partir de los cuales se mantienen más o menos constantes. Por su parte, en los cultivos con glucosa como única fuente de carbono el valor máximo se alcanzó a los 10 días de incubación.

En la figura 51 se representa el grado de decoloración de los cultivos a lo largo de estos 10 días. Se puede comprobar que esta se produjo dentro de las primeras 48 horas de incubación.

En los filtrados de los cultivos sin pigmento se pudo comprobar (Figura 50) que la absorbancia a 280 nm aumentó con el tiempo aunque con una cinética distinta a la detectada en los cultivos adicionados del pigmento. No obstante a los 10 días de incubación se obtuvieron valores muy similares.

Por otra parte, en estos cultivos sólo puede apreciarse un ligero incremento de la coloración de los filtrados (Figura 51).

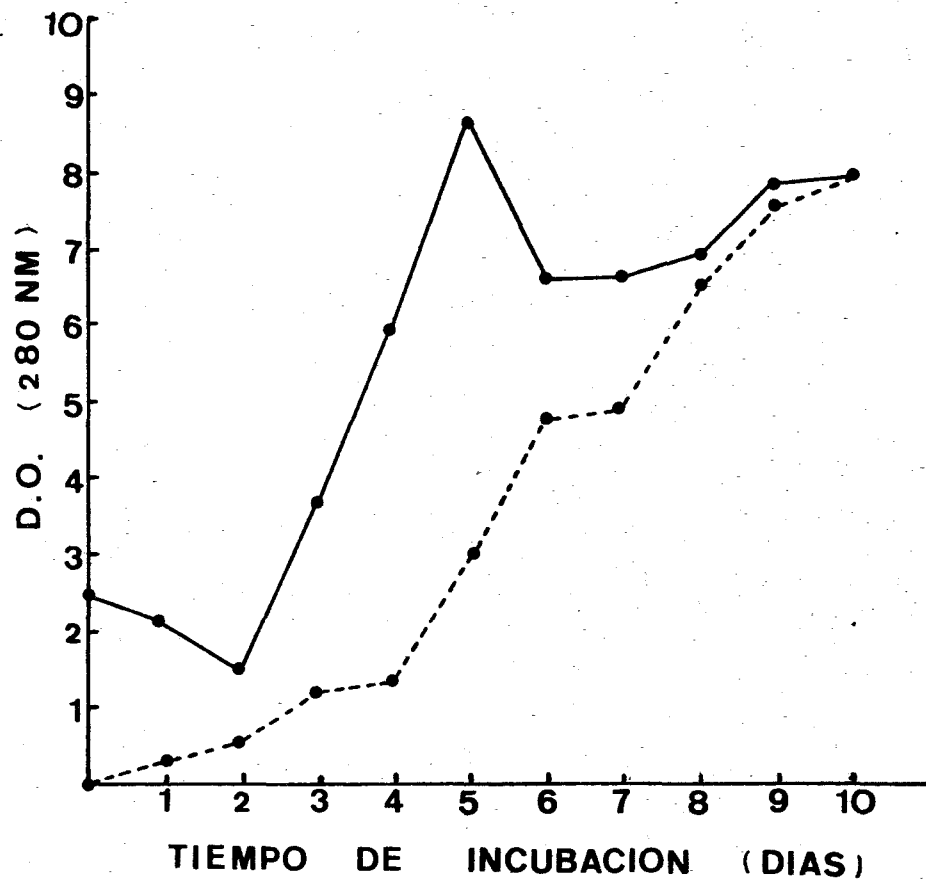


Figura 50: Evolución de la absorbancia a 280nm en los filtrados de los cultivos de Aspergillus terreus.

Con glucosa como fuente de carbono: ●---●

Con glucosa y pigmento: ●—●

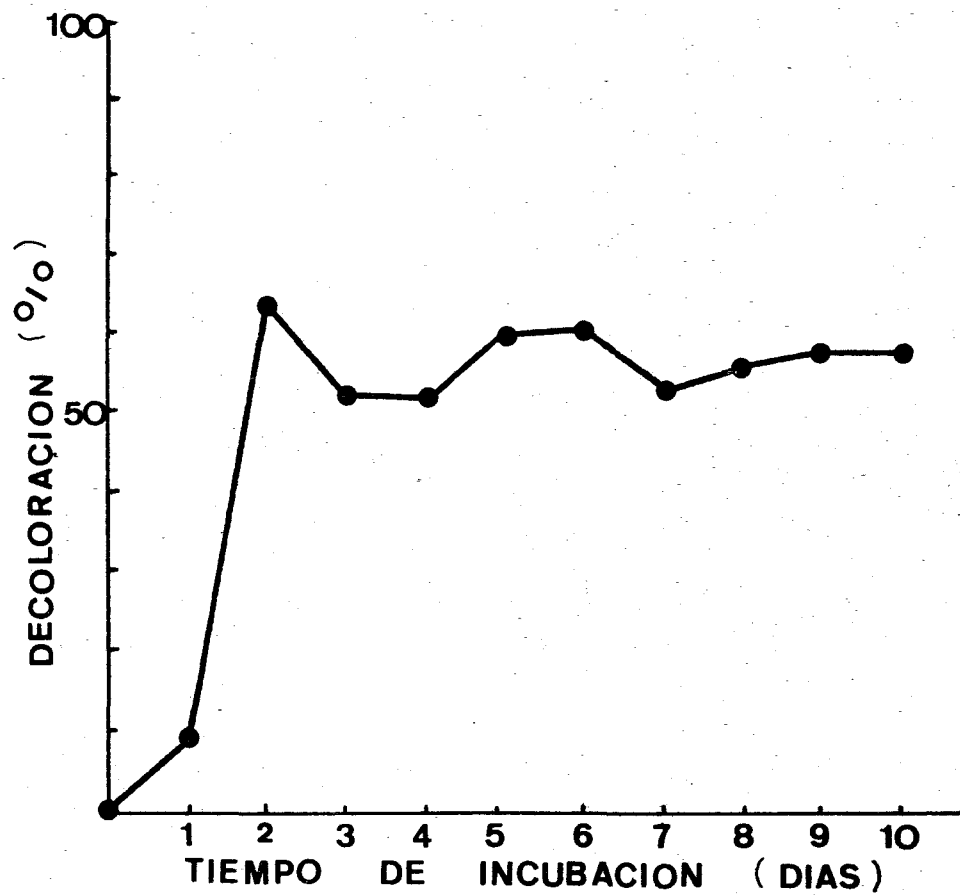


Figura 51: Decoloración (%) de los filtrados de los cultivos de Aspergillus terreus en medio preparado con glucosa y pigmento.

III.2.3.4. Modificación del pH

En la figura 52 se representa la evolución del pH de los filtrados de los cultivos. Pudo apreciarse una fuerte disminución del pH (similar en ambos casos) que precede al inicio del desarrollo máximo.

III.2.3.5. Incidencia sobre las características del pigmento

Dada la modificación de la coloración obtenida en los cultivos de este microorganismo, se procedió a la comparación de las características del pigmento procedente de los matraces decolorados y de su respectivos controles. Para ello, las alícuotas oportunas se sometieron a filtración por "Sephadex", CLAE, CCF y CG-espectrofotometría de masas.

En ningún caso se han obtenido resultados que indiquen de un modo inequívoco que la decoloración va asociada a la degradación del pigmento. Sin embargo, sí son observables ciertas diferencias entre los filtrados de los distintos cultivos. Así, en los sobrenadantes de los cultivos con glucosa como única fuente de carbono, por un lado se aprecia un ligero incremento en el número de compuestos detectados y por otro una mayor cantidad en los compuestos comunes (Figuras 53 y 54) En la tabla 21 se indica la caracterización de los compuestos detectados por CG.

III.2.3.6. Efecto de las variaciones del pH sobre la coloración.

Dada la fuerte acidificación del cultivo, como paso previo al inicio de la etapa de mayor tasa de crecimiento y a las consecuencias que los cambios de pH tienen sobre la coloración y solubilidad de las soluciones fenólicas, se realizaron las comprobaciones y experiencias que a continuación se detallan.

En primer lugar de los cultivos control y preparados con pigmento descritos en la figuras 49, 50, 51 y 52 se determinó la D.O. de los filtrados una vez que se llevaron a pH 7, y se determinó el grado de

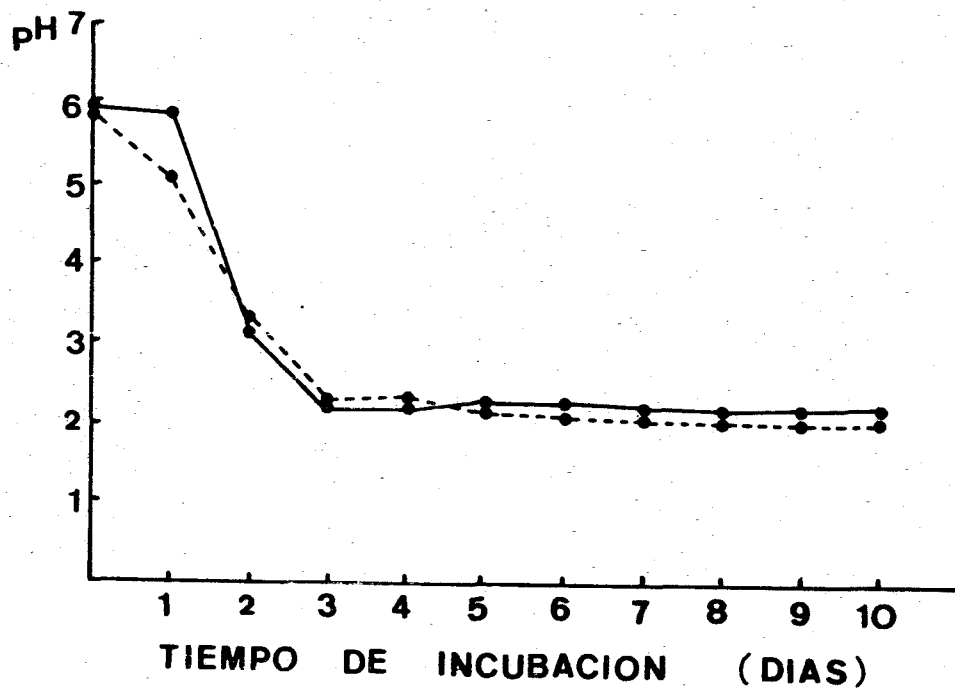


Figura 52. Evolución del pH en los filtrados de los cultivos de *Aspergillus terreus* con glucosa: ●- - - -● ; con glucosa y pigmento: ●- - - -● .

Tabla 21. Relación de compuestos producidos por *Aspergillus terreus* (detectados en los sobrenadantes de los cultivos con glucosa y en los preparados con glucosa y pigmento).

(1) detectados solamente en los cultivos con glucosa

(2) detectados en ambos tipos de sobrenadantes pero identificados como distintos por espectrofotometría de masas.

Tiempo de retención	Sustancia
2,359	1,6- octadien 3 ol 3,7 dimetil
(1) 2,670	biciclo (2,2,1) heptan 2-ona,1,7,7- trimetil
(1) 3,291	3-ciclohexeno-1-metanol, ,
6,694	ácido benceno acético, 4-hidroximetil,
8,948	ácido benceno acético, -4-hidroxi-6-metil (9
9,074	1 pentanona, 1-(4-hidroxifenil
10,180	2(1H)-piridinona, 4-hidroxi-6-metil (9
11,250	benceno 2-metoxi-1-(2-nitroetenil)-3-
11,890	desconocido
12,860	desconocido
13,088	benceno,1,4-dimetil-2,5-bis (1-metil éter)
13,530	serratinina,8-acetato
13,927	desconocido
14,180	desconocido
16,700	benceno,2-metoxi-1-(2-nitroetenil)-3
(2)17,280	ácido licosanoico metil ester
(3)17,576	desconocido
(3)18,850	desconocido
(3)19,890	desconocido

(1) detectados solamente en los cultivos con glucosa

(2) detectados en ambos tipos de sobrenadantes pero identificados como distintos por espectrofotometria de masas.

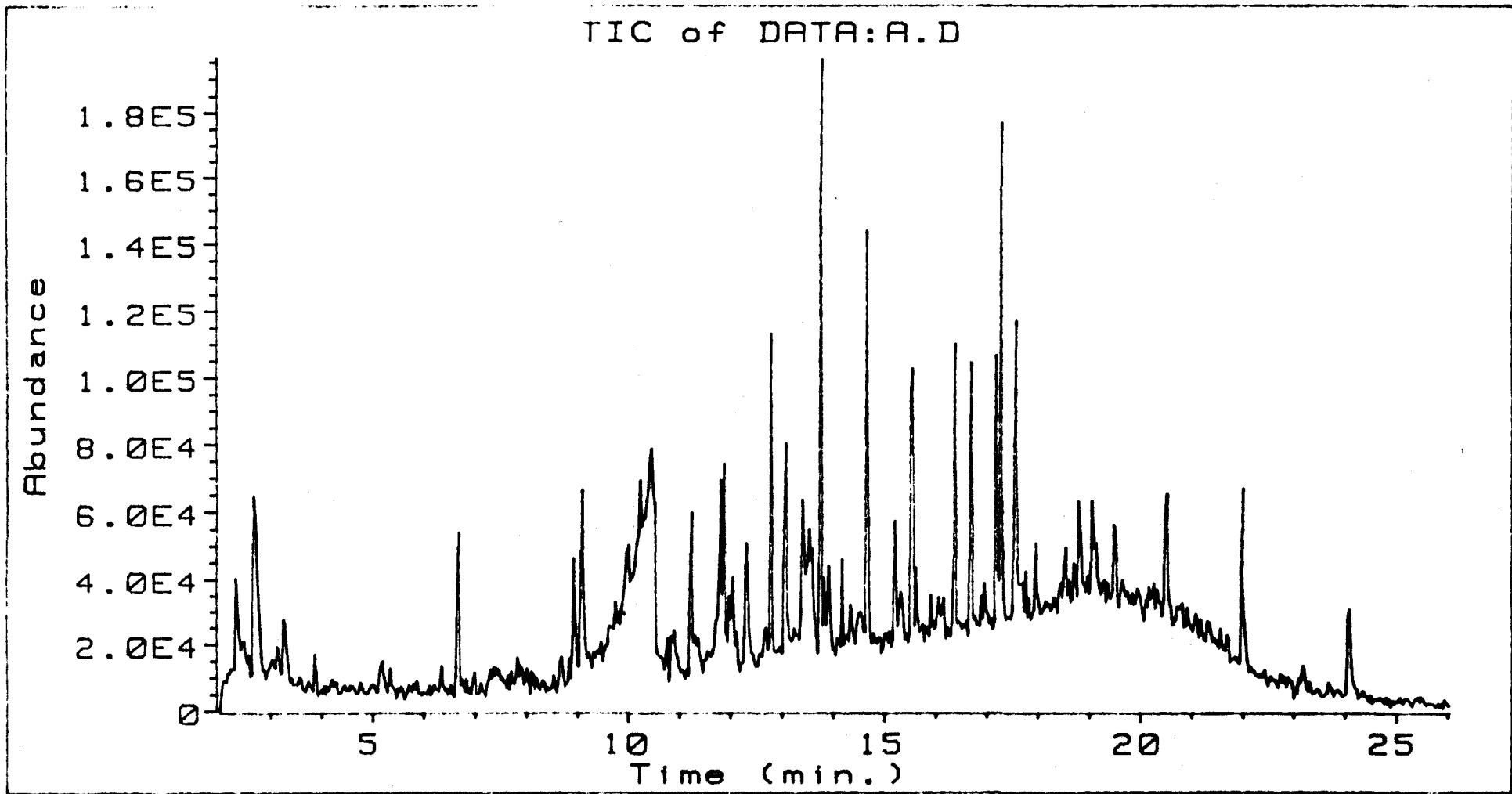


Figura 53. Perfil cromatográfico obtenido por cromatografía de gases de los extractos etéreos de los filtrados de los cultivos de Aspergillus terreus en medio con glucosa como única fuente de carbono y energía.

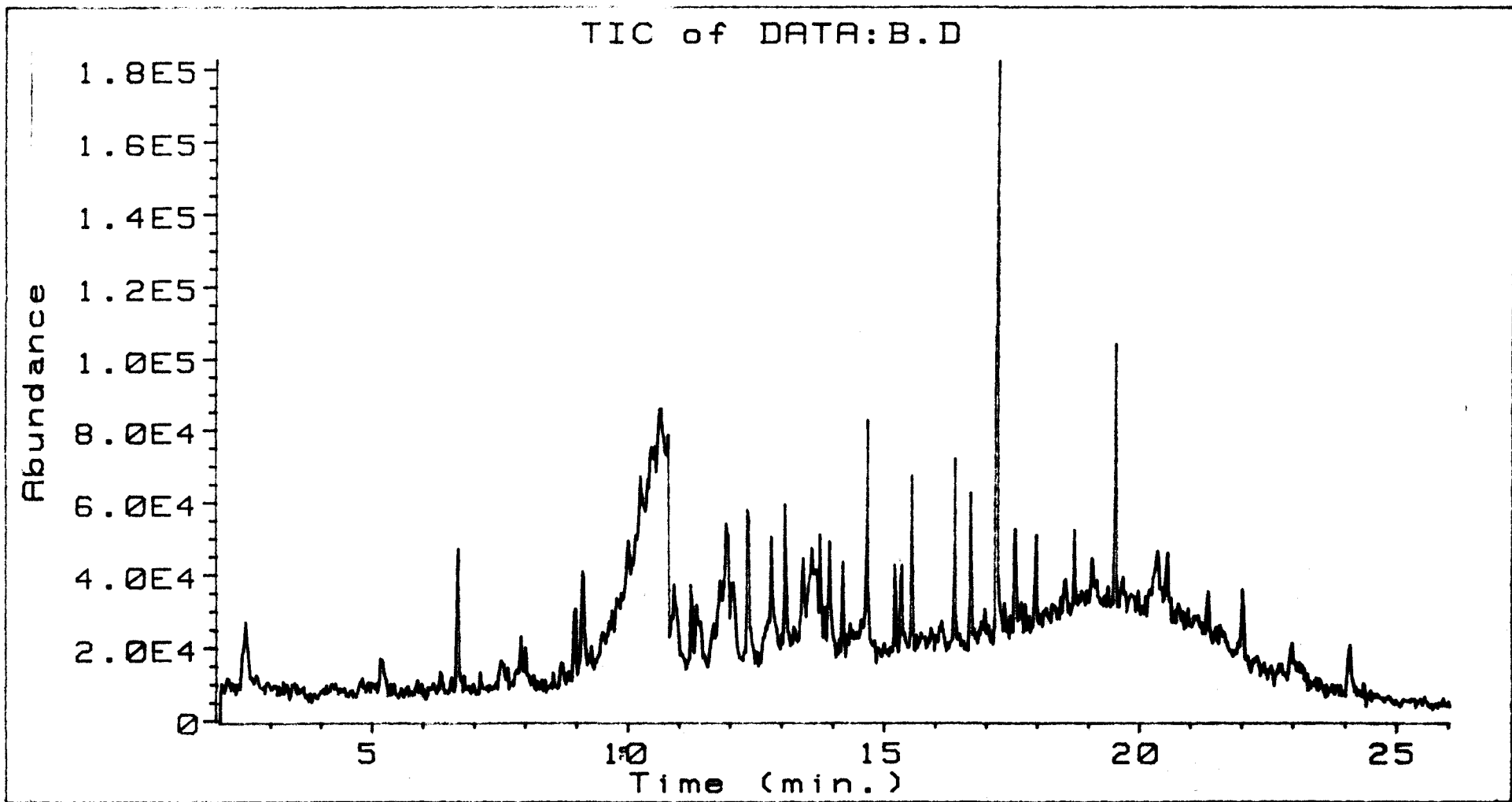


Figura 54: Perfil cromatográfico obtenido por cromatografía de gases de los extractos etéreos de los filtrados de de los cultivos de Aspergillus terreus en medio con glucosa y pigmento como fuentes de carbono.

RESULTADOS

decoloración respecto a las soluciones control, eliminando la interferencia de la coloración producida por el propio metabolismo del hongo. Pudo comprobarse la existencia de una etapa de decoloración inicial muy rápida seguida de una estabilización del color y un incremento final de la decoloración (Figura 55).

En segundo lugar se realizó un nuevo experimento de cuatro días de duración, en el cual el pH de los cultivos se llevó a 7 antes de someterlos a la filtración (Figura 56). De este modo se obtienen unos valores de decoloración, que son menores a los obtenidos en el caso anterior.

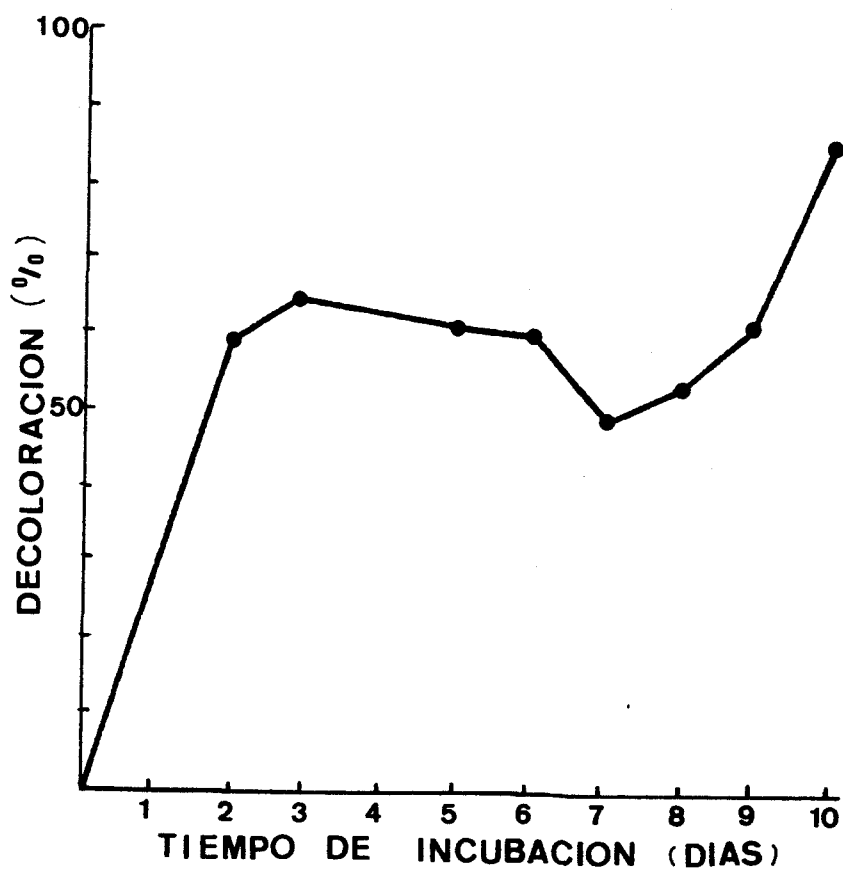


Figura 55. Decoloración (%) determinado a pH 7 de los filtrados de los cultivos de Aspergillus terreus, eliminando la interferencia producida por los productos metabólicos del microorganismo.

$$\text{Decoloración} = 1 - \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: Absorción a 458 nm y pH 7 de los filtrados de los cultivos realizados con pigmento.

B: Absorción a 458 nm y pH 7 de los filtrados de los cultivos realizados con glucosa como única fuente de carbono y energía.

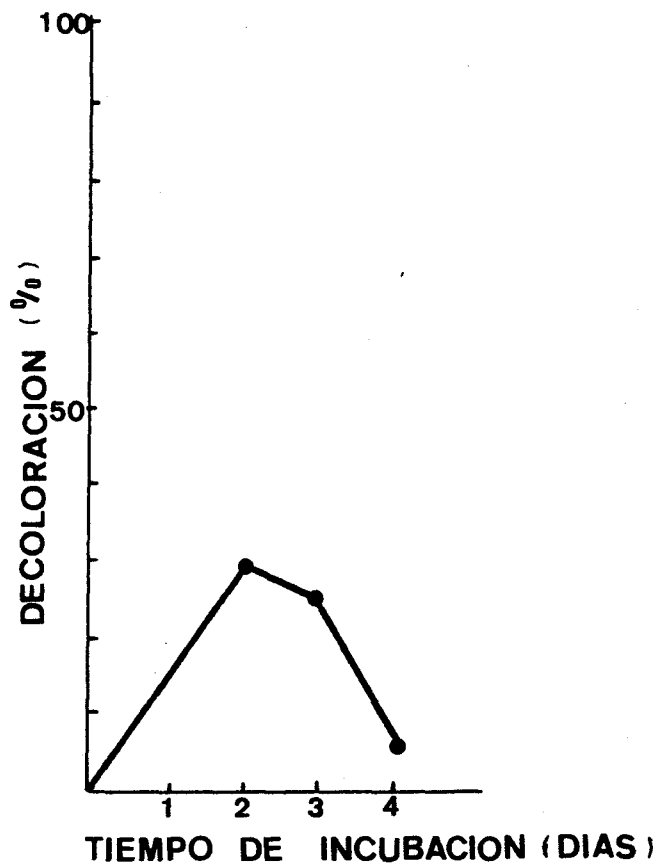


Figura 56. Decoloración (%) en los cultivos de Aspergillus terreus llevados a pH 7 antes de separar el micelio por filtración.

DISCUSSION

I. CARACTERIZACION DEL PIGMENTO DEL ALPECHIN

Como ya se ha indicado, entre la relativamente densa bibliografía en torno al alpechín solamente se dispone de dos artículos cuyo objeto de estudio es el pigmento característico de estos residuos. Por ello fue necesario antes de abordar el estudio de la transformación microbiana de esta macromolécula (o mezcla de ellas), detenernos en la determinación de algunas de sus propiedades físico-químicas más relevantes.

El rendimiento del proceso de obtención del pigmento es ligeramente inferior al 0,1% (p/v), que contrasta fuertemente con el reseñado por Ragazzi *et al.* (1967). Esta diferencia puede atribuirse entre otras posibles razones a diferencias en el tipo de alpechín utilizado (no precisan el modo de extracción de aceite del que derivaron sus muestras, aunque presumiblemente se tratase de un sistema tradicional, ni las modificaciones sufridas antes de su análisis) y a que tales autores calculan el rendimiento antes de la purificación con bromuro de cetil-trimetil amonio (en este caso en nuestras muestras es del orden del 1 %), que se aproxima bastante más al valor indicado por este grupo italiano, en torno al 5 %.

La absorción en la parte visible del espectro no muestra ninguna característica especial, siendo lo más reseñable, el incremento de absorción al disminuir la longitud de onda. En la porción ultravioleta se observa la misma tendencia que en el visible, pero con un hombro en la absorción alrededor de los 280 nm. Tal comportamiento en ambas regiones del espectro es común en el de otros fenoles poliméricos (Janshekar *et al.*, 1981; Lobo Bedmar, 1985).

En el infrarrojo el espectro obtenido es muy similar al recogido por Sáinz-Jiménez *et al.* (1986) para el pigmento del alpechín, y para las preparaciones de lignina utilizadas en estudios de biodegradación (Haraguchi & Hatakayama, 1981; Hibuchi, 1981; Casares *et al.*, 1986), así como para sustancias húmicas (Lobo Bedmar, 1985).

Para poder aproximarnos a la composición fenólica del pigmento fue necesario romperlo mediante la oxidación enérgica con óxido de cobre, tal y como ha sido aplicada por Kögel y Botche (1985) para la detección de derivados de la lignina en capas húmicas de suelo forestal.

Curiosamente ocho de los once compuestos identificados por nosotros por esta técnica coinciden con los descritos por estos autores como derivados de la lignina a partir del humus, apareciendo como peculiares del pigmento el aldehído protocatéquito, tirosol y ácido p-hidroxifenil propiónico.

Esta coincidencia de resultados apoya la visión del pigmento del alpechín como un representante más del amplio grupo de fenoles poliméricos naturales, de origen vegetal incluidos bajo la denominación genérica de lignina y compuestos relacionados.

Por otra parte, estos resultados suponen un avance en el conocimiento de la composición química del pigmento, dada la variedad de compuestos fenólicos detectados, puesto que como se ha mencionado anteriormente, hasta el presente sólo se había detectado la pirocatequina, los ácidos salicílico, cafeico y p-cumárico (Ragazzi *et al.*, 1967; Sáinz-Jiménez, 1986).

Por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas de los extractos etéreos de las preparaciones de pigmento, se han detectado los compuestos indicados en la tabla 3 y figura 9 de resultados.

Todos estos resultados concuerdan con una descripción del pigmento del alpechín como una macromolécula constituida por una matriz fenólica a la que se encontrarían unidos restos de sustancias capaces de unirse a los distintos radicales presentes sobre tales anillos: polisacáridos, ácidos grasos y metales (según Sáinz Jiménez *et al.*, 1986), azúcares (según Ragazzi *et al.*, 1967), situación similar a la descrita para la lignina y ácidos húmicos. La analogía con la lignina se ve reforzada por la coincidencia de sustancias detectadas tras la oxidación con óxido de cobre del pigmento con las descritas por Kögel y Bochte (1985) para los derivados de la lignina en la materia húmica de suelo.

En cuanto a la heterogeneidad molecular de las preparaciones de pigmento descritas por otros autores, en nuestro caso solamente hemos podido detectar la presencia de un pico por "Sephadex" G-100, en contraposición a los dos picos detectados por Sáinz-Jiménez *et al.* (1986) y los cuatro detectados por Ragazzi *et al.* (1967).

Las características que se acaban de describir corresponden a sustancias de baja capacidad intrínseca de transformación, siendo

importante su presencia en los residuos, no sólo por su alta recalcitrancia, sino porque su presencia dificulta la biotransformación de las sustancias a ella unidas, como es el caso más ilustrativo de la protección que la lignina ejerce sobre la celulosa de los residuos lignocelulósicos a los microorganismos celulolíticos.

II. CULTIVOS DE ENRIQUECIMIENTO

II.1. CONDICIONES DE ENRIQUECIMIENTO

El diseño de los cultivos de enriquecimiento se realizó con la expectativa de encontrar microorganismos capaces de degradar el pigmento del alpechín, y si fuera posible que disminuyese su coloración.

Como solución mineral se eligió la de Sparrins *et al* (1974) por haber sido utilizada en estudios similares. Como fuente de carbono principal o exclusiva se eligió el pigmento del alpechín. Realmente este procedimiento trae como consecuencia que el crecimiento de los microorganismos a sus expensas sea bastante lento. De hecho, en el caso de la búsqueda de microorganismos ligninolíticos, es frecuente el empleo de fuentes de carbono alternativas ya que este sustrato no es utilizado para el soporte del crecimiento por los microorganismos ligninolíticos (Kirk, 1984; Kirk & Farrel, 1987; Kirk *et al*, 1981).

Tanto es así, que se han sintetizado derivados artificiales de lignina unidos a aminoácidos, de modo que la actividad ligninolítica produce la liberación del sustrato a utilizar como fuente de carbono (el aminoácido). De esta forma se ha pretendido facilitar el "screening" de microorganismos ligninolíticos (Tien *et al*, 1987).

La presencia de una fuente de carbono alternativa al pigmento, junto a este en los cultivos de enriquecimiento, complica enormemente el trabajo de selección de los microorganismos degradadores del pigmento, puesto que habría que aplicar en cada caso (en cada muestreo) la técnica analítica adecuada para evidenciar tal transformación. Es por ello que usualmente se utiliza el sustrato a degradar como única fuente de carbono en este tipo de estudios (Gibson, 1984). Además, y fue el factor decisivo en la elección del pigmento como única fuente de carbono, tuvimos en cuenta la propia composición del pigmento; además de la matriz fenólica posee, como ya se ha dicho,, otras moléculas de fácil degradación intrínseca (polisacáridos, proteínas, etc.). De esta manera hemos utilizado una estrategia que recuerda a la propuesta con el empleo de los aminoácil derivados de la lignina.

Otro factor considerado en la elaboración de los medios de cultivo para el enriquecimiento, lo constituye la posibilidad de que la

transformación buscada sea ejercida por cepas auxótrofas. Por ello parte de los enriquecimientos se realizaron en medios de cultivo enriquecidos con factores de crecimiento. Sin embargo, como se indica en el apartado correspondiente de resultados, esta alternativa no supuso resultados ventajosos, por lo que tales cultivos no fueron considerados.

Con todas estas consideraciones se diseñó el protocolo inicial de aislamiento de microorganismos indicado en la figura 5.

Sin embargo, los resultados indicados en el apartado correspondiente motivaron que fuese necesario modificar esta plan de actuación previsto inicialmente. Del desarrollo experimental aplicado se han obtenido los tres grupos microbianos:

- bacterias obtenidas según el protocolo inicial de aislamiento,
- bacterias obtenidas de cultivos decolorados,
- hongo obtenido de cultivos decolorados.

II.2. CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS AISLADAS

El carácter bastante restringido de la variedad de grupos taxonómicos aislados concuerda, de una parte con el carácter restrictivo impuesto por la fuente de carbono utilizada, y de otra las bacterias aisladas han sido incluidas en general en grupos relacionados frecuentemente con la transformación de moléculas aromáticas.

A pesar de que el espectro de características determinadas sobre los aislamientos es bastante estrecho, creemos que es suficiente para el enfoque del trabajo propuesto (Moreno *et al.*, 1987). Por otra parte, puede comprobarse como las cepas incluidas en el grupo más numeroso (*Pseudomonas*) quedan distribuidas en 6 grupos fisiológicos, que aunque no siempre, parecen estar relacionados con sus capacidades de transformación de moléculas aromáticas, tal y como se indicará más adelante. Sin embargo, curiosamente no se ha obtenido ningún actinomiceto, de aislamiento frecuente sobre sustratos aromáticos (Starr *et al.*, 1981) y también en el caso de suelos contaminados con alpechín (Paredes *et al.*, 1987).

Las proporciones de los grupos mayoritarios son muy similares para las cepas procedentes del protocolo inicial y las obtenidas de cultivos decolorados, de modo que no parece adecuado el criterio del grupo taxonómico para relacionarlo con la decoloración o no de los medios de cultivo.

Así, puede apreciarse que el grupo de *Pseudomonas* oscila siempre en torno al 50 % como mínimo del total de aislamientos en cada uno de los muestreos (Tabla 10).

Sin embargo, el no aislamiento de *Pseudomonas* en los cultivos ALN decolorados (que era dominante en los aislamientos efectuados según el protocolo inicial) y el aislamiento de las dos únicas cepas de *Bacillus* en estos cultivos decolorados, sugiere una modificación de los cultivos de naturaleza desconocida.

Dado que las cepas de *Bacillus* y *Vibrionaceae* aisladas proceden de cultivos de enriquecimiento incubados durante largos periodos de tiempo (superior a 1 mes) estos dos grupos pueden considerarse como flora secundaria, desarrollada presumiblemente a expensas de productos de transformación promovida por *Pseudomonas* y/o bacterias corineformes.

El modo de realización de los enriquecimientos no presupone necesariamente la capacidad metabólica general de un microorganismo obtenido de tales cultivos, si está claro en este caso concreto que son las características del sustrato y de las condiciones de incubación las determinantes del aislamiento de estas cepas particulares. Los grupos taxonómicos mayoritariamente aislados incluyen a bacterias que característicamente se relacionan con la biodegradación de moléculas aromáticas de difícil biotransformación (Gibson, 1984; Kawakami, 1981; Kuwahara, 1981). De este modo, aunque como se verá más adelante no es un razonamiento aplicable a todas las cepas, parece que puede relacionarse el aislamiento de éstas con la característica aromaticidad de la matriz del pigmento como hemos indicado previamente y ha sido descrito por otros autores (Sáinz Jiménez et al, 1986).

III. DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS DE BAJO PESO MOLECULAR

En aras de apoyar experimentalmente el razonamiento expuesto en el apartado anterior, se realizaron unos experimentos en los que se ensayó la capacidad degradadora de varios núcleos aromáticos por las bacterias aisladas. Para ello se utilizó la mezcla de los ácidos aromáticos indicados por Balice y Cera (1984) como representante del alpechín, y que según las ideas que se tienen respecto al origen del pigmento, se encuentran entre los precursores de este (Sáinz Jiménez *et al.*, 1986; Goupy & Fleuriet, 198).

En una primera aproximación a este problema, se determinó el mejor modo de procesar los inóculos y los cultivos con esta finalidad. La técnica analítica seleccionada fue la cromatografía líquida de alta eficacia de los extractos etéreos de los cultivos tras su incubación con cada una de las cepas, como ha sido sugerido por Goycoolea *et al.* (1985) para el consumo de compuestos de bajo peso molecular derivados de la lignina. Esta técnica, sin embargo, posee una limitación, cual es la de que la no detección de un determinado compuesto inicial, no indica necesariamente su metabolización.

Es sabido que la apertura del anillo aromático por acción microbiana sólo es posible cuando sobre el núcleo aromático existen al menos (y generalmente) dos grupos hidroxilo, y es sólo a partir de ese momento cuando puede producirse la apertura anular, que conduce a la formación de intermediarios comunes del metabolismo microbiano (Gibson & Subramanian, 1984). Sin embargo, la presencia de hidroxilos fenólicos condiciona la posibilidad de polimerización de estos intermediarios (Kirk & Farrell, 1987; Buswell & Odier, 1987) traduciéndose la modificación en la imposibilidad de extraer el polímero formado y en el cambio en la coloración del medio de cultivo, que toma una coloración marrón o más o menos negra (Cheftel & Cheftel, 1980). Por ello, en los resultados que a continuación se discuten, la metabolización o no de un determinado ácido hay que entenderla bien como mineralización completa o bien como biotransformación que conduce a su eliminación del medio de cultivo como ácido libre, con la implicación que ello tiene y que se indicará más adelante.

Otra limitación de la técnica analítica la proporciona la manipulación ciertamente laboriosa de las muestras, con lo que la acumulación de errores puede ser importante. Por ello hemos elegido como criterio para definir un determinado sustrato como metabolizado significativamente por determinado microorganismo, cuando de los medios de cultivo se recupera una cantidad inferior al 50 % de la recuperada de los respectivos controles.

El carácter prototrofo de las cepas aisladas, queda prácticamente asegurado por la metódica seguida para su aislamiento. Sin embargo es evidente que la composición del medio de cultivo influye decisivamente en el comportamiento metabólico del microorganismo. Esto se comprueba en la figura 19. Puede apreciarse que la inoculación de los microorganismos junto a restos del medio de cultivo en el que se han obtenido contribuye muy favorablemente a la metabolización de estos compuestos. Solamente en el caso de la cepa 334 (*Pseudomonas*) se obtiene un mejor resultado con la eliminación de los restos del medio de cultivo de los inóculos.

Una vez elegida la inoculación directa de los microorganismos sobre el medio de cultivo con los ácidos fenólicos se procedió a determinar el patrón de degradación de los ácidos presentes por cada una de las cepas aisladas, puesto que como se ha indicado para los compuestos de bajo peso molecular derivados de la lignina, el patrón de degradación es específico de cepa, con lo que es conceptualmente posible encontrar asociaciones de tales microorganismos capaces de realizar una degradación exhaustiva de esta mezcla aromática, como han indicado Goycoolea *et al.* (1985).

Solamente seis de las cepas procedentes del protocolo inicial de aislamiento (tres *Pseudomonas*) no crecieron en el medio mineral con los ácidos aromáticos como fuente principal de carbono. Tales cepas procedieron de los cultivos TB y AC, pero nunca de los AL, lo que podría correlacionarse con el contenido fenólico del alpechín (Balice & Cera, 1984; Vazquez Roncero *et al.*, 1974). Por otra parte, esta consideración está relacionada a su vez con el origen a partir del inóculo de alpechín de una mayor proporción de cepas capaces de metabolizar 3 ó más de los ácidos presentes y de la única cepa que hemos podido demostrar que es capaz de metabolizar 5 de los seis ácidos ensayados (figuras 20 a 23).

Por otra parte, el aislamiento de cepas incapaces de metabolizar estos compuestos aromáticos, puede explicarse de distintas maneras. De acuerdo con la idea de que la capacidad de metabolizarlos es un parámetro clave del enriquecimiento efectuado, puede tratarse de cepas que no son capaces de realizar esta actividad más que en condiciones en las que el propio medio de cultivo de los enriquecimientos o alguno (s) de los microorganismos presentes (y no necesariamente coaislados con ellos) les suministra las condiciones adecuadas para realizar tal actividad. Este hecho parece ser bastante frecuente en la naturaleza, como lo ponen de manifiesto los estudios de biotransformación realizados con comunidades microbianas (Slater & Lovatt, 1984).

Por otro lado, podría tratarse de cepas que siendo capaces de degradar los compuestos aromáticos presentes en el cultivo de enriquecimiento (que no se conocen con precisión), son incapaces de metabolizar los compuestos ensayados por la especificidad de sustrato o de inducción de los enzimas responsables de tal actividad (Ramos & Timmins, 1987).

Una tercera posibilidad desplazaría la importancia de la metabolización de compuestos aromáticos en la selección de las cepas desarrolladas en el medio de cultivo. Esta consideración está basada en el hecho de que aunque el componente más recalcitrante del pigmento se encuentra constituido por la matriz fenólica, se encuentra unida a otros tipos de estructuras moleculares, como son ácidos grasos, proteínas y polisacáridos. Sin embargo, profundizar en este aspecto del problema no nos ha parecido adecuado dado nuestro interés en microorganismos capaces de degradar los componentes más recalcitrantes del residuo, que como queda dicho anteriormente, corresponde a la fracción aromática.

Como ya se ha indicado, la modificación en los grupos taxonómicos aislados de los cultivos decolorados frente a los del protocolo inicial parece relacionarse con la modificación de las condiciones del medio de cultivo, presumiblemente por acción de los que hemos considerado como flora primaria (*Pseudomonas* y bacterias corineformes), en cuanto a la transformación de la estructura aromática del pigmento. Esta pérdida de la capacidad de degradación de los compuestos aromáticos en los cultivos decolorados se refleja en el número de cepas incapaces de metabolizar ninguno de los ácidos, pues su

proporción es mucho mayor entre la colección de cepas procedentes de los cultivos decolorados (5 cepas de un total de 17 frente a 6 de un total de 36, tabla 18).

Treinta y dos las cepas del protocolo inicial (y doce de los cultivos decolorados) son capaces de transformar, al menos uno de los ácidos fenólicos ensayados (tabla 18). Este resultado confirma que la capacidad de transformar el pigmento se relaciona de algún modo con la capacidad de transformar compuestos aromáticos de bajo peso molecular, si bien dicha capacidad parece perder importancia en la selección microbiana producida en los matraces decolorados, como ya se ha indicado.

Sin embargo, prácticamente el 50 % de ambas colecciones de cepas transforman uno o dos de los ácidos presentes, lo que sugiere que lo realmente importante para la selección no es la variedad de ácidos consumidos, sino la capacidad de transformar tales ácidos (cafeico y/o p-hidroxifenil acético, tabla 18).

La degradación de los anillos aromáticos puede resultar más o menos fácil en función de los distintos radicales que se pueden transformar (Gibson & Subramanian, 1984; Bayly & Barbour, 1984), de modo que parece conveniente dar una visión más de detalle de la susceptibilidad a la transformación de cada uno de los ácidos ensayados.

El modo en que se ha realizado el experimento permite comprobar que sólo en dos casos (ácidos cafeico y p-hidroxifenil acético) se transforman sin que se alteren el resto de componentes aromáticos de la mezcla (tabla 18), lo cual puede interpretarse de varias maneras: por un lado puede significar que los enzimas responsables de la transformación de estos ácidos son los más específicos, de modo que solamente actuarán alterando la estructura del ácido en particular.

Por otro lado, la técnica analítica utilizada, indica alteración de alguno de los ácidos, tanto si la modificación se produce sobre el anillo aromático, como sobre la cadena lateral (acética o propionica).

Es frecuente que la degradación de estos ácidos implique la ruptura de la cadena lateral, dando el ácido benzoico correspondiente (Gibson & Subramanian, 1984). De este modo, el ácido cafeico puede verse

sometido a la acción de dos rutas degradativas: rotura directa del anillo aromático, o una β -oxidación previa a tal rotura (Kawahara, 1981). Por ello, estos casos en los que la degradación es sólo para el ácido p-hidroxifenil acético o cafeico podrían representar la oxidación exclusiva de la cadena lateral, o bien distintos intermediarios de la modificación del anillo. Así por ejemplo el ácido vanílico ha sido detectado como intermediario en la degradación del ácido ferúlico (Fukuzumi, 1981). En apoyo a esta sugerencia se encuentran los cromatogramas representados en la figura 38. En ella se encuentra que la degradación exclusiva del ácido cafeico (figura 38) determina la aparición simultánea de dos nuevos picos, con tiempo de retención de 2,9 y 5,8 minutos. Cuando va asociada a la degradación de ácido p-hidroxifenil acético, solamente se detecta el pico nuevo de tiempo de retención 5,8 (figura 38), mientras que la degradación simultánea de p-hidroxifenil acético, vanílico y siríngico, el único pico que se detecta es el correspondiente a un tiempo de retención de 2,6 minutos.

Por otro lado, y en conexión con el origen de las cepas que degradan el ácido cafeico, cabe indicar que aquellas que degradan solamente este ácido procedieron siempre de cultivos inoculados con alpechín, lo que de algún modo, puede relacionarse con la importancia que sobre las propiedades del alpechín como sustrato para el crecimiento de los microorganismos, puede tener su alto contenido en este ácido (Vazquez Roncero *et al.*, 1974). Puede relacionarse también con la proporción mayoritaria de cepas capaces de degradar este ácido y con el hecho de que los aislamientos procedentes de los nódulos de alpechín son los que consumen más eficazmente dicho compuesto (Figura 39).

Excluyendo pues, a los ácidos p-hidroxifenil acético y cafeico, la degradación del resto de ellos (vanílico, siríngico y verátrico) solamente se ha detectado en circunstancias en las cuales se modifican los niveles de algún otro componente (Tabla 18).

Los anillos de los ácidos aromáticos metoxilados, solamente pueden romperse una vez que se han eliminado los grupos metoxilo. Tal demetoxilación puede ser realizada por demetilases (que liberan formaldehído) o por lacasas (que libera metanol) (Kawahara, 1981). Frecuentemente la demetoxilación constituye el paso limitante del proceso, de modo que la metabolización de estos ácidos, solamente se produce tras tiempos de incubación relativamente largos (Kawakami, 1981).

Por otro lado, la presencia de un -OH libre en posición para respecto al carboxilo, se ha revelado como un parámetro clave para la rotura rápida del anillo aromático (Kawakami, 1981). De este modo, la metoxilación del anillo, y la presencia del hidroxilo libre en para, parecen justificar el aislamiento de un menor número de cepas capaces de metabolizar los ácidos metoxilados (Figura 4):

-con un -OH libre en para:

*monometoxilados: ácido vanílico, 16 cepas

*bimetoxilados: ácido siríngico, 9 cepas

-CH₃OH en para:

*bimetoxilado: ácido verátrico, 4 cepas

*trimetoxilado: ácido 3,4,5 trimetoxibenzoico, 0 cepas

Otro aspecto interesante de estos resultados, lo constituye la constatación de que el ácido siríngico, predominante en ligninas de angiospermas (Kawakami, 1981) y en el alpechín (Balice & Cera, 1984) es susceptible a la degradación microbiana, pero no es capaz de inducir su propia degradación, para lo que es necesaria la presencia de un inductor adecuado (por ejemplo ácido vanílico) para que pueda producirse su metabolización.

De este modo, la detección de estos ácidos metoxilados en el alpechín puede relacionarse con su escasa biotransformación. Además, de ahí también el valor potencial de cepas microbianas con capacidad metabolizadora de estos ácidos. En nuestro caso, solamente una de las cepas es capaz de transformar cinco de los seis ácidos fenólicos mayoritarios del alpechín.

La eliminación de los efectos indeseables de los residuos ricos en componentes fenólicos se ha abordado desde distintos puntos de vista, como son por tratamientos químicos (Keating *et al.*, 1978), enzimáticos (Carmichael *et al.*, 1985) y microbiológicos (Anselmo & Novais, 1984). En nuestro caso, los resultados obtenidos parecen apuntar el interés de las cepas consumidoras de estos compuestos en la eliminación de sus análogos aromáticos de bajo peso molecular del alpechín. Sin embargo, con tal finalidad, tales bacterias habrían de resistir la acción antimicrobiana de los residuos, cosa que se ha demostrado que ocurre (resultados no mostrados), puesto que solamente tres cepas de *Bacillus*, una *Vibrionaceae* y una corineforme son sensibles a dichos efectos antibacterianos. De ahí que actualmente una de las alternativas surgidas de este estudio sea la utilización como microorganismos eliminadores de la actividad antibacteriana del alpechín.

Como hemos demostrado recientemente (Rodríguez *et al.*, 1988) la actividad antibacteriana del alpechín se correlaciona con su contenido en fenoles de bajo peso molecular, de ahí el interés por comprobar si alguna de estas cepas, siendo insensible al efecto antibacteriano del alpechín, y caracterizada por su capacidad de transformar sustancias aromáticas, pueden ser objeto de su empleo en la eliminación de estos efectos indeseables del alpechín, lo cual podría suponer un avance considerable en la utilización del residuo con distintas finalidades.

Por su parte, el conjunto de las cepas obtenidas de los cultivos decolorados presentan una distribución de *Pseudomonas* y corineformes muy similar a la descrita para las obtenidas del protocolo inicial (Figura 14), con una proporción del 70,6 % de *Pseudomonas*, análoga a la ya comentada para la cepa procedente del protocolo de aislamiento inicial. Especialmente interesante nos parece el posible empleo de la cepa 121, al cual degrada cuatro ácidos presentes en la mezcla ensayada, sin aparecer la típica coloración parda, tan frecuente en la acción de las otras cepas.

Lo que parece más significativo de estos agrupamientos lo constituye, a nuestro entender, el no aislamiento de cepas de *Pseudomonas* de los cultivos decolorados TBN. Entre tales cepas, además solamente una de ellas es capaz de degradar solamente uno de los ácidos

ensayados, lo cual apoya la deducción expresada anteriormente de que en estos cultivos decolorados la capacidad de degradar los compuestos aromáticos habría dejado de tener la importancia que le hemos supuesto para la discusión de los resultados obtenidos en los aislamientos procedentes del protocolo inicial. En tal caso, es posible que sea la mayor disponibilidad de estos nutrientes, procedentes de la modificación del pigmento, sus polisacáridos o sus proteínas, los que determinarían el predominio de estas cepas. De hecho, ninguna cepa de *Bacillus* degradó ninguno de los ácidos.

Por lo demás, contemplando la capacidad de degradar compuestos aromáticos por estas cepas en su conjunto podemos comprobar una diferencia respecto a la capacidad de metabolización de ácidos aromáticos, que creemos puede ser bastante significativa, cual es que la mayor facilidad de degradación por estas cepas ya no corresponde al ácido cafeico, sino al p-hidroxifenil acético (Figura 24).

Otro aspecto de interés derivado de este estudio lo constituye la comprobación de que son los *Pseudomonas* el grupo en el que se presenta la capacidad de degradar un mayor número de ácidos, perteneciendo todos los *Pseudomonas* capaces de consumir más de dos ácidos fenólicos a los subgrupos P₁ y P₆, los dos grupos que producen un pigmento verdosos difusible. Estas bacterias serían de elección en los intentos de degradación de los compuestos aromáticos de bajo peso molecular del alpechín, dado que en general las corineformes no han mostrado capacidad de degradar los ácidos siríngico ni verátrico.

IV. DECOLORACION DE LAS SOLUCIONES NUTRITIVAS PREPARADAS CON EL PIGMENTO DEL ALPECHIN

El modo en que se ha podido aislar el microorganismo decolorador supuso la modificación drástica de las condiciones de enriquecimiento, una vez que se obtuvo la evidencia de la imposibilidad, o al menos gran dificultad, de obtener bacterias con esta capacidad.

Con objeto de relacionar la decoloración con las posibles modificaciones estructurales del pigmento, los sobrenadantes de los cultivos decolorados fueron analizados por CLAE y capa fina. Pudo comprobarse que la decoloración va asociada a la acumulación de cierto número de fenoles libres (Figura 41), los cuales pueden proceder de la despolimerización del pigmento, como ha sido descrito repetidas veces en la biodegradación de lignina (Buswell & Odier, 1987; Kirk & Farrell, 1987). Sin embargo, en sus resiembras, a pesar de haberse detectado la decoloración, ésta fue menos manifiesta y en sus sobrenadantes no se detectó la presencia significativa de compuestos aromáticos libres (Figura 42). Esta diferencia quizá pueda atribuirse a que los análisis se realizaron inmediatamente de haber detectado la decoloración, treinta días antes que en el caso anterior. Por otra parte este resultado es análogo al observado por Kawakami (1981) en el estudio de degradación de lignina por *Pseudomonas ovalis*, sugiriendo una ruptura sucesiva de los terminales aromáticos del polímero, más bien que una despolimerización extensiva.

En este caso, en que no pudo detectarse la acumulación de sustancias fenólicas, se trató de encontrar diferencias entre los cultivos y sus respectivos controles mediante la oxidación con óxido de cobre del material aromático presente. Pudo comprobarse un menor rendimiento en derivados aromáticos en las muestras procedentes de los matraces decolorados (Figuras 23). Este resultado parece consecuente con que en los cultivos decolorados se haya producido el consumo del pigmento, al menos en lo que se refiere a su porción aromática.

Por su parte, el empleo de la cepa SC-26 de *Phanerochaete chrysosporium* rindió también cultivos decolorados, en los cuales se detectó la acumulación de compuestos aromáticos (Figura 48), lo cual se

ha interpretado como prueba de la degradación de compuestos aromáticos (Kirk & Farrell, 1987).

La decoloración de residuos industriales en los que el color es debido a sustancias fenólicas constituye un problema para su aprovechamiento o vertido, se ha intentado por distintos métodos, siendo bastante fructíferos los métodos en los que se emplean ciertos hongos (Marton *et al.*, 1969; Eaton *et al.*, 1980; Sundman *et al.*, 1981; Eaton *et al.*, 1982; Livernoche *et al.*, 1982; Livernoche *et al.*, 1983) o enzimas (Chang *et al.*, 1983; Joyce *et al.*, 1984; Paice & Jurasek, 1984). Tanto es así que incluso se han obtenido patentes (Kirk, 1983). Básicamente estos métodos se han basado en el empleo de hongos obtenidos en estudios relacionados con la degradación de ligninas.

En los estudios relacionados con la lignina, como ya se ha indicado en la introducción, la degradación del polímero fenólico se ha mostrado como un proceso idiofásico, tras una trofofase soportada por distintos sustratos más o menos complejos, como pueden ser desde simples azúcares o aminoácidos a polisacáridos de tipo celulolítico (Kirk & Farrell, 1987). En cualquier caso, se requiere la presencia de un sustrato metabolizable que permita la producción de la masa miceliar que en el momento adecuado sea capaz de inducir el sistema ligninolítico.

El carácter errático en la aparición de la decoloración y de su reproducción, durante los enriquecimientos, determinó que nos planteásemos la posibilidad de orientar el aislamiento del hipotético microorganismo (o microorganismos) decolorador a unas condiciones más cercanas a las utilizadas en cultivos ligninolíticos. De este modo, se ensayó el efecto sobre la reproducción de la decoloración de dos fuentes de carbono alternativas, el etanol y la glucosa, por haber sido ensayados en cultivos de este tipo (Fukuzumi, 1981). Además se ensayó el efecto de la limitación en nitrógeno, puesto que como es bien sabido constituye un factor clave en la regulación de los sistemas ligninolíticos (Kirk & Farrell, 1987; Buswell & Odier, 1987).

La aparición profusa de un hongo no detectado hasta entonces en los cultivos en los que se reprodujo la decoloración, nos indujo a su aislamiento y caracterización. Este crecimiento masivo del hongo, solamente en presencia de una fuente de carbono alternativa al pigmento, parece ser un ejemplo de una de las aseveraciones indicada anteriormente

en el sentido de que la biotransformación fúngica de la molécula aromática no proporciona energía para el crecimiento.

El género *Aspergillus* es con el *Penicillium* probablemente el hongo más abundantes y más fácilmente encontrado, tanto por su amplísima distribución geográfica, como por su presencia en aire, suelo y prácticamente todo tipo de sustancias orgánicas en descomposición (Alexopoulos & Mims, 1979).

A su vez, esta especie tiene una distribución universal en el suelo, aislándose más frecuentemente de suelos cultivados, siendo su microhábitat preferente la rizosfera de distintos vegetales cultivados. Pero también se ha aislado de productos cosechados, siendo de interés para la presente discusión su descripción en aislamiento de pulpa procedente de molturación para papel. Se ha citado su capacidad de degradar almidón, pectina, tanino, ácido úmico, celulosa, restos vegetales celulósicos, paja y fibras de yute. También es capaz de degradar productos plastificantes. Entre los productos metabólicos derivados de su crecimiento sobre distintos medios de cultivo se encuentran distintos ácidos fenol carboxílicos (gentísico, 6-metil salicílico), hidroxibenzaldehidos, benzoquinonas, hidroxibenzofenonas,, ácido indolacético, pudiendo manifestar efectos mórbidos en el hombre y distintos animales (Domsch *et al*, 1980).

De entre toda la actividad metabólica descritas para este hongo, creemos que merece la pena destacar su posición como el más potente celulolítico de todas las especies del género y su capacidad para desarrollarse en ciertos aceites vegetales en descomposición, como el de palma (citado en Raper y Fennell, 1965).

Ciertamente en cuanto a su origen no puede precisarse si es propiamente oriundo de las aceitunas empleadas, o bien que estas fueron colonizadas durante su descomposición por esporas procedente del suelo donde se encontraban aquellas. Esta última posibilidad nos parece más verosímil, dado que aunque se ha aislado de ciertos frutos o semillas, su hábitat por excelencia lo constituye el suelo, como se ha indicado anteriormente. Además esta consideración puede venir apoyada por el hecho de que la decoloración de los cultivos, se ha detectado, se ha detectado, al menos en algún momento de la incubación de los cultivos de enriquecimiento, con los tres tipos de inóculo, lo cual si se atribuye a

la acción de un solo microorganismo, *Aspergillus terreus*, habla en favor de un origen común, el cual muy bien puede ser el suelo.

De otro modo, la versatilidad metabólica de microorganismo apoya su interés potencial en los estudios de degradación del alpechín, no ya sólo por su acción decolorante, sino también por su acción lipolítica. Además de que la producción de ciertas sustancias químicas por el hongo, puede reavivar el interés del empleo del alpechín con unas finalidades actualmente impensadas.

De los resultados de la decoloración observada en los cultivos de enriquecimiento con la no detección de la presencia del hongo hasta que no se adicionó una fuente de carbono alternativa, se podría deducir que la capacidad del pigmento del alpechín para soportar su crecimiento es bastante baja, al menos en las condiciones utilizadas. Sin embargo, parece que la presencia del pigmento en soluciones nutritivas con el 2 % de glucosa, ejercen cierto efecto favorable sobre el crecimiento (Figura 49), alcanzándose en ambos casos la fase estacionaria de crecimiento entre los cinco y siete días de incubación.

Por lo que respecta a la decoloración observada, esta puede deberse a dos causas principales; a la adsorción del pigmento por el micelio o bien a la modificación química de la macromolécula. Ambos procesos han sido argumentados en la decoloración fúngica de residuos fenólicos (Tono *et al.*, 1968; Livernoche *et al.*, 1981; Livernoche *et al.*, 1983).

Como ya se ha indicado, el tratamiento de residuos lignocelulósicos proporciona residuos líquidos de color negro-marronáceo, que de algún modo evocan la coloración del alpechín. Dado que los hongos de la podredumbre blanca son capaces de metabolizar la lignina de la madera, así como en presencia de hidratos de carbono, se han intentado procesos de clarificación utilizando tales microorganismos (Fukuzumi, 1981).

De diez hongos seleccionados por Fukuzumi (1981) en base a la presencia de fenol oxidasas, seis de ellos fueron capaces de decolorar un medio de cultivo adicionado de un derivado de la lignina, hasta dejar una coloración amarillenta. De ellos, los mejores resultados los proporcionó el cultivo de *Tinctoporia barbonica*, que eliminó el 99 % de

la coloración tras cuatro días de incubación, siendo el etanol y la glucosa los sustratos que proporcionaron mejores resultados. Sus experimentos condujeron a la conclusión de que la decoloración se debe tanto al consumo del polímero, como a su modificación estructural asociada a la pérdida de tamaño molecular.

Por otro lado se ha descrito un proceso de decoloración promovido por una cepa de *Aspergillus*, debido a adsorción (Tono *et al.*, 1969).

Ni los análisis por cromatografía de gases, espectrofotometría de masas, cromatografía líquida de alta eficacia ni cromatografía en capa fina permiten soportar la hipótesis de la despolimerización como responsable de la decoloración. Por ello recurrimos a una nueva hipótesis que concordase con los resultados obtenidos. Se basa en las modificaciones de solubilidad de los compuestos fenólicos en respuesta a los cambios de pH. En general la acidificación de las soluciones produce su precipitación (Livernoche *et al.*, 1981 y 1983). Como puede apreciarse en las figuras 49 y 52 el inicio del desarrollo del hongo coincide con la acidificación del medio de cultivo.

En tales condiciones disminuye la solubilidad del polímero con lo que puede ser adsorbido sobre la masa miceliar, puesto que no se observa precipitación alguna en los cultivos. Este precipitado sí aparece sin embargo en los controles acidificados. Por ello deducimos que probablemente resulte de la adsorción del precipitado.

La decoloración alcanza su valor máximo a los dos días de incubación con glucosa como fuente de carbono, estabilizándose después el color (Figura 51). De tratarse de un proceso de adsorción, la decoloración parece que debería prolongarse hasta los 5 días de incubación, al cabo de los cuales se alcanza la fase estacionaria (Figura 49). En segundo lugar, cabe indicar que la absorción a 280 nm y 260 nm se ha utilizado para la cuantificación de otros polímeros fenólicos análogos al pigmento del alpechín (Fukuzumi, 1981) y parece adecuado su empleo en nuestro caso en la cuantificación del contenido de pigmento en el alpechín, dado el hombro que aparece en el espectro UV del pigmento (Figura 13). Sin embargo, como es obvio, y ha sido advertido por otros autores (Janshakar *et al.*, 1981) tales métodos de cuantificación plantean un problema serio, cuando como en nuestro

caso, el crecimiento del hongo provoca la acumulación en el medio de sustancias que absorben en ese tramo del espectro (Figura 50). Sin embargo, si creemos poder utilizar tales medidas para la cuantificación del pigmento en solución en aquellas condiciones en que el crecimiento del hongo es insuficiente para que se produzcan cantidades que interfieran con la dosificación. Esto es precisamente lo que ocurre durante los dos primeros días de incubación, que como ya hemos indicado, corresponde al periodo de decoloración. Por tanto, según esta consideración la decoloración observada se debería a la desaparición de parte del pigmento de los filtrados. Basándonos en la disminución de la absorción a 280 nm, podemos sugerir que en el pigmento se haya producido la rotura de las estructuras aromáticas dentro del polímero, como ha sido argumentado para la lignina, puesto que esta banda de absorción se ha atribuido a los anillos aromáticos no sustituidos en meta (Janshekar et al, 1981).

Por otra parte, la producción de compuestos aromáticos por el hongo interfiere en la lectura de la decoloración a pH neutro, puesto que medios de cultivo con glucosa como única fuente de carbono adquieren una coloración amarillenta, similar a aquella que queda en los cultivos decolorados. Este hecho puede contribuir a impedir la progresión de la decoloración más allá del segundo día de incubación (Figura 50).

La reneutralización del pH de los filtrados no permite recuperar la coloración inicial (Figura 55). Los resultados que se muestran en esta figura se han obtenido eliminando el efecto colorante que tienen los productos metabólicos del hongo. Puede apreciarse que la decoloración se produce dentro de los dos primeros días de incubación, puesto que el aumento que se registra hacia el final del experimento lo entendemos como un artefacto del cálculo matemático aplicado. Así, en la figura 50 se comprueba que la producción por el hongo de las sustancias que interfieren en la coloración, sigue distinta cinética en el medio de cultivo preparado con pigmento que aquel en el que la glucosa es la única fuente de carbono. A partir del 72 día de incubación los valores de absorbancia a 280 nm tienden a igualarse en ambos cultivos, obteniéndose el mismo valor al finalizar el experimento. Por ello el valor de la decoloración tiende a aproximarse al 100 %, aunque en realidad se mantenga prácticamente constante.

Como corolario cabe indicar que la decoloración se produce a nuestro entender como consecuencia de fenómenos físico-químicos: precipitación y adsorción. Con objeto de ver la influencia que ejerce la precipitación en la decoloración observada, se realizó un nuevo experimento en el que tal y como recomienda Livernoche *et al* (1981 y 1983) el pH se neutralizó antes de la separación de la masa micelar (Figura 56). En tal caso la máxima decoloración observada es sólo del orden de un 30 %, aproximadamente la mitad de la obtenida cuando la neutralización era posterior a la filtración y tras eliminar la interferencia de las sustancias producidas por el hongo (Figura 55).

En consecuencia prácticamente la mitad de la decoloración que provoca el hongo es irreversible, si bien se ve interferida por la coloración que proporciona los metabolitos fúngicos.

CONCLUSIONES

1. Los métodos analíticos aplicados al pigmento macromolecular del alpechín permiten establecer su analogía con la lignina y polímeros relacionados con ella.

2. De los grupos taxonómicos bacterianos aislados, se deduce que son los *Pseudomonas* los de mayor capacidad de crecer a expensas del pigmento del alpechín y por ello las que con mayor probabilidad han de ser capaces de degradar este sustrato. Por contra las cepas de *Bacillus* y *Vibrionaceae* aisladas parecen representar la flora secundaria cuyo desarrollo sólo es posible tras la modificación por *Pseudomonas* y/o corineformes.

3. De los tres tipos de inóculos utilizados la mayor proporción de cepas capaces de metabolizar tres o más ácidos fenólicos, y de la única degradadora de cinco de ellos procedieron de los cultivos de enriquecimiento preparados con alpechín, lo que demuestra la importancia que la capacidad de metabolizar estos ácidos tiene en la selección de los microorganismos capaces de desarrollarse en este residuo.

4. La capacidad de crecer con el pigmento del alpechín como fuente de carbono se correlaciona con la capacidad de degradar los ácidos cafeico y/o p-hidroxifenil acético.

5. La incapacidad de las bacterias aisladas de decolorar el pigmento del alpechín no se debe a su incapacidad de metabolizar compuestos aromáticos, sino posiblemente a su incapacidad de separarlos de la matriz polifenólica de la que forman parte como ha sido sugerido para ciertos microorganismos relacionados con la degradación de la lignina.

6. Aunque no puede descartarse que la decoloración por *Phanerochaete chrysosporium* esté influida por la adsorción, la detección de compuestos aromáticos característicos del pigmento en los sobrenadantes de los cultivos y la no modificación de pH, sugieren que en tal caso la decoloración puede relacionarse con su despolimerización.

7. La biodegradación del pigmento del alpechín por los microorganismos desarrollados en los cultivos de enriquecimiento en las condiciones experimentales utilizadas, no conlleva la decoloración de sus soluciones. Es la modificación de su estado físico lo que conduce a la disminución del color, al menos en los experimentos a corto plazo.

8. Aunque la decoloración promovida por *Aspergillus terreus* Thom necesita de una fuente de carbono alternativa, como ocurre con los sistemas ligninolíticos, el proceso se produce durante la parte inicial del crecimiento activo y no en la fase estacionaria, como ocurre en estos últimos. Esta decoloración se debe a la precipitación de parte del pigmento y adsorción de dicho precipitado a la masa micelial.

BIBLIOGRAFIA

ANDREONI, V. & BESTETTI, G. 1985. Comparative analysis of different *Pseudomonas* strains that degraded cinnamic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 22: 479-484.

ALEXOPOULOS, C. J. & MIMS, C. W. 1979. (eds.), Class Ascomycetes. Subclass Plectomycetidae, En *Introductory Mycology*, 3ª Edición, pp. 282-307, John Wiley and Sons, New York.

ANSELMO, A. M. & NOVAIS, J. M. 1984. Isolation and selection of phenol degrading microorganisms from an industrial effluent. *Biotechnol. Lett.*, 6: 601-606.

ARPINO, A. & CAROLA, A. 1978. Lo smaltimento delle acque di vegetazione provenienti dagli impianti di estrazione dell'olio d'oliva. Nota II: l'incenerimento delle acque di vegetazione. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, LV: 24-28.

AVENI, A. 1984. Biogas recovery from olive oil mill waste water by anaerobic digestion. En Ferrero, G.L., Ferranti, M.P., Naveau, H. (eds.), Elsevier publish, New York, pp. 489-491.

BALICE, V. & CERA, O. 1984. Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatographic method. *Grasas y Aceites*, 35: 78-80.

BALICE, V., CARRIERI, C., CERA, O. & DI FAZIO, A. 1986. Natural biodegradation in olive mill effluents stored in open basins. En FAO (ed.), *International Symposium on Olive By Products Valorization*, pp. 101-118, Sevilla.

BAYLY, R.C. & BARBOUR, M.G. 1984. The degradation of aromatic compounds by the meta and gentisate pathways. En Gibson, D.T. (ed.) Microbial Degradation of Organic Compounds, pp. 253-294. Marcel Dekker, Inc. New York.

BERTOLDI, M., FILIPPI, C. & PICCI, G. 1986. Olive residue composting and land utilization. En FAO (ed.) International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 307-320. Sevilla, .

BROUILLARD, R. 1982. Chemical structure of Anthocyanins. En Markakis, P. (ed.) Anthocyanins as Food Colors, pp. 1-140. Academic Press, New York.

BUSWELL, J.A., MOLLET, B. & ODIER, E. 1984. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency. Fems Microbiol. Lett. 25: 295-294.

BUSWELL, J.A. & ODIER, E. 1987. Lignin Biodegradation. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 6: 1-60.

CAIN, R.B. 1981. The uptake and catabolism of lignin-related aromatic compounds and their regulation in microorganisms. En Kirk, T. K., Higuchi, T., Chang, H. (eds.) Lignin Biodegradation, Chemistry, and Potential Applications. Vol. I, pp. 21-60. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

CARMICHAEL, R., FEDORAK, P. M. & PICKARD, M. A. 1985. Oxidation of phenols by chloroperoxidase. Biotechnol. Lett. 7: 289-294.

CAROLA, C., ARPINO, A & LANZANI, A. 1975. Lo smaltimento delle acque di vegetazione provenienti dagli impianti di estrazione dell'olio dalle olive e studio della loro possibile utilizzazione, Riv. Ital. Sostanze Grasse, 52; 335-340.

CARRIERI, C. 1978. Ultrafiltration of vegetation waters from olive oil extraction plants, I. Preliminary experiences, Oli Grassi Derivati, XIV; 29-32.

CASARES, A., MELO, G.M.P.F., FERRAZ, J.F.P., RICARDO, C.P.P. 1986. Differences in ability of *Phytophthora cambivora* and *P. cinnamomi* depolarize lignin.

CHANG, H. M., JOYCE, T. W., CAMPBELL, A. G., GERRAD, E. D., HUYNH, V. B. & KIRK, T. K. 1983. Fungal decolorization of bleach plant effluents. En Higuchi, T., Chang, H. M., Kirk, T. K. (eds.), Recent Advances in Lignin Biodegradation Research, pp. 257, Uni. Publishers Co. Ltd, Tokyo.

CHEFTEL, J. C. & CHEFTEL, H. 1980. Pardeamiento enzimático y pardeamineto no enzimático. En Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos, pp. 291-308, Acribia, Zaragoza.

CRUESS, W. V. & ALSBER, C. L. 1934. The bitter glucoside of the olive. J. Amer. Chem. Soc. 56; 2115-2117.

CURI, K., VELIOGLU, S. G. & DIYAMANDOGLU, V. 1980. Treatment of olive oil production wastes. En Curi, K. (ed.) Treatment and disposal of liquid and solid industrial wastes, pp. 189-205, Pergamon Press, Oxford, New York.

DE ANDRES CONDE, M. C., & GARCIA GARCIA, J. R. 1982. El problema de los vertidos de los alpechines en España. Bol. Infor. Medio Ambiente, 22: 28-35.

DE CARO, M. & GALAMINI LIGORI, M. 1959. Attività antibiotica di un estratto desunto dalle acque di vegetazione delle olive. Rend. Ist. Super. Sanita, 22: 223-243.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H. (eds.). Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. Academic Press. Londres.

EATON, D., CHANG, H. M., JOICE, T. W., JEFFRIES, T. W. & KIRK, T. K. 1982. Methods obtains fungal reduction of the color extraction stage kraft bleach effluents. Tappi, 65: 89-92.

EATON, D. C., CHANG, H. M. & KIRK, T. K. 1980. Fungal decolorization of Kraft plant effluents. Tappi, 63: 103-108.

ESCOLANO BUENO, A. 1975. Ensayos de eliminación de alpechines por vertido en balsas o lagunas para su infiltración y evaporación. Grasas y Aceites, 26: 387-396.

EVANS, N. C. 1963. The microbiological degradation of aromatic compounds. J. Gen. Microbiol. 32: 177-184.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A. 1958 a. Estudio del alpechín para su aprovechamiento industrial. Obtención de levaduras alimenticias. Grasas y Aceites, 9: 249-258.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A. 1958 b. Características y eliminación de las aguas residuales de las almazaras, Bol. Oleicultura Int. **46**: 11-21.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A. 1977 a. Depuración de las aguas residuales en las industrias de aceite de oliva, Grasas y Aceites. **28**: 113-121.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A. 1977 b. Problemas de aprovechamiento y depuración de las aguas residuales de las almazaras. Ponencia presentada en la 13ª Reunión Plenaria de Miembros del Instituto de la Grasa y sus Derivados, Sevilla.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A. 1986 a. Current status of research and technology concerning the problems posed by vegetation water. En FAO (ed.) International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 11-15. Sevilla.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A. 1986 b. Vegetation water used as a fertilizer. En FAO (ed.) International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 321-330. Sevilla.

FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A., NAVARRO GAMERO, R., LEON CABELLO, R., GARCIA BUENDIA, A. J. & MAESTRO JUAN DE JAUREGUI, G. M. 1982. Depuración anaerobia del alpechín como fuente de energía, Grasas y Aceites. **33**: 265-270.

FLEMING, H. P. & ETCHELLS, J. L. 1967. Occurrence of an inhibitor of lactic bacteria in green olives, J. Appl. Microbiol. **15**: 1178-1184.

FLEMING, H. P., WALTER, W. M. & ETCHELLS, J. L. 1969. Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *J. Appl. Microbiol.* 18: 856-860.

FLEMING, H. P., WALTER, W. M. & ETCHELLS, J. L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *J. Appl. Microbiol.* 26: 777-782.

FRANCIONE, G., TELCH, C. & VIGILIA, A. 1986. Cryogenesis applied for vegetation water: treatment and the nutritional value of the final product. En FAO (ed.). *International Symposium on Olive By Products Valorization*, pp. 285-298. Sevilla.

FRIAA, A., MENSI, R. & KALLEL, A. 1986. Application of vegetation water in civil engineering-soil treatment with vegetation water. En FAO (ed.) *International Symposium on Olive By Products Valorization*, pp. 263-273. Sevilla.

FUKUZUMI, T. 1981. Microbial decolorization and defoaming of pulping waste liquors. En Kirk, T. K., Higuchi, T., Chang, H. *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*. Vol. II, pp. 161-177.

GANTER, J. 1978. Problemas d'environnement dans l'industrie des corps gras: II. Les eaux residuaires de raffineries d'huiles alimentaires. *Rev. Francaise des Corps Gras*, 25: 59-66.

GIBSON, D. T. (ed.). 1984. *Microbial degradation of Organic Compounds*. Marcel Dekker, Inc. New York.

GIBSON, D. T. & SUBRAMANIAN, V. 1984. Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. En Gibson, D. T. (ed.), Microbial Degradation of Organic Compounds, pp. 181-252. Marcel Dekker, Inc. New York.

GOLD, M., H., KITSUKI, M. & MORGAN, M. A. 1983. Oxidative degradation of lignin by photochemical and chemical radical generating system. Photochem. Photobiol. 38: 647-652.

GOMEZ CORDOVES, C., GARRIDO, D. & DIEZ, C. 1978. Etude des composés phenoliques des eaux-de-vie vieilles en bois de chene. Bull. Liaison Groupe Polyphenols. 8: 369-373.

GONZALEZ, M. D. 1986. Ensayo de sensibilidad de bacterias aisladas de suelo frente al alpechín. Memoria de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.

GOUPY, P. & FLEURIET, A. 1986. Caracteristique du brunissement enzymatique de l'olive. Bull. Liaison Groupe Polyphenols. 13: 455-457.

GOYCOOLEA, M., SEELENFREUND, D. & VICUNA, R. 1986. Monitoring bacterial consumption of the low molecular weight lignin derivatives by high performance liquid chromatography. Enzyme. Microbiol. Technol. 8: 213-216.

HARAGUCHI, T. & HATAKEYAMA, H. 1981. Biodegradation of lignin related polystyrenes. En Kirk, T. K., Higuchi, T., Chang, H. (eds.), Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications, Vol II, pp. 147-159., CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

HIGUCHI, T. 1981. Microbial degradation of dilignols as lignin models. En Kirk, T. K., Higuchi, T., Chang, H. (eds.), Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications, Vol. I, pp.171-193. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

HUCKER, G. J. & CONN, H. J. 1923. Methods of Gram staining, Tech. Bull. N.Y. St. Agric. Exp. Sta. N° 93.

HUGH, A. & LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentation versus oxidative metabolisms of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26.

IELMINI, M., SANNA, M. & PELOSI, N. 1976. Indagine sulle acque di rifinto degli stabilimenti di produzione olearia in provincia di Roma possibilità di depurazione. Ind. Aliment. 15: 123-131.

JANSHEKAR, H., BROWN, C. & FIETCHER, A. 1981. Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrophotometry. Analitica Chim. Acta. 130: 81-91.

JANSHEKAR, H. & FIETCHER, A. 1982. On the bacterial degradation of lignin. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14: 47-50.

JOYCE, T. W., CHANG, H. M., CAMPBELL, A. G. J., GERRAD, E. D. & KIRK, T. K. 1984. A continuous biological process to decolorize bleach plant effluents. Biotechnol. Adv. 2: 301-309.

JUVEN, B., SAMISH, Z., & HENIS, Y. 1968. Identification of oleuropein as a natural inhibitor of lactic acid fermentation of green olives. Israel J. Agr. Res. 18: 137-138.

JUVEN, B., SAMISH, Z., HENIS, Y., & JACOBY, B. 1968. Mechanism of enhancement of lactic acid fermentation of green olives by alkali and heat treatment. J. Appl. Bacteriol. 31: 200-207.

KAWAKAMI, H. 1981. Degradation of lignin-related aromatics and lignins by several Pseudomonads. En Kirk, T. K., Higuchi, T., Chang, H. (eds.), Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications. Vol II. pp. 103-125. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Florida.

KEATING, E. T., BROWN, R. A. & GREENBERG, E. S. 1978. Proc. 33rd. Ind. Waste Conf. pp. 464-470. Purdue Univ.

KIRK, T. K. 1983. Degradation and conversion of lignoceluloses. En Smith, J.E., Berry, D.R., Kristiansen, B. (eds.), The Filamentous Fungi. Vol 4. pp. 266-295. Edward Arnold, Londres.

KIRK, T. K. 1984. Degradation of lignin. En Gibson, D. T. (ed.), Microbial Degradation of Organic Compounds. pp. 399-437. Marcel Dekker, Inc. New York.

KIRK, T. K. & FARREL, R. L. 1987. Enzymatic combustion the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.

KIRK, T. K., SCHULTZ, E., CONNORS, W. J., LORENZ, L. F. & ZEIKUS, J. G. 1978. Influence of culture parameters of lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277-285.

KIRK, T. K., HIGUCHI, T. & CHANG, H. (eds.). 1981. Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. Vols. I y II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

KIRK, T. K. & TIEN, M. 1986. Lignin degrading activity of *Phanerochaete chrysosporium* burds, Comparison of cellulase-negative and other strains. Enzyme Microb. Technol. 8:75-80.

KIRK, T. K., TIEN, M., KERSTEN, M., MOZUCH, D. & KALYANARAMAN, B. 1983. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*: mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -aryl ether substructure of lignin. Biochem. J. 236: 279-287.

K6GEL, I. & BOTCHER, R. 1985. Characterization of lignin in forest hummus layers by high performance liquid chromatography of cupric oxide oxidation products. Soil. Biol. Biochem. 17: 637-640.

KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London). 178: 703.

KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. Willians and Wilkins Co. Baltimore.

KUBO, I., MATSUMOTO, A. & TAKASE, I. 1985. A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (OLEACEAE). Is oleuropein a phytoalexin precursor?, *J. Chem. Ecol.* **11**: 251-263.

KUWAHARA, M. 1981. Metabolism of lignin-related compounds by bacteria. En Kirk, T. K., Higuchi, T., Chang, H. (eds.), *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications*, Vol II, pp. 127-146, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

LAPPIN, H. M., GREAVES, M. P. & SLATER, J. H. 1985. Degradation of the herbicide mecoprop(2-(2-methyl-4 chlorophenoxy) propionic acid) by a synergistic microbial community, *Appl Environ. Microbiol.* **49**: 429-433.

LIVERNOCHE, D., JURASEK, L., DESROCHERS, M. & VELIKY, I. A. 1981. Decolorization of a kraft mill effluent with fungal (*Coriolus versicolor*) mycelium immobilized in calcium alginate gel, *Biotechnol. Lett.* **3**: 701-706.

LIVERNOCHE, D., JURASEK, L., DESROCHERS, M. & VELIKY, I. A. 1983. Removal of color from kraft mill waste waters with culture of white rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus versicolor*, *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 2055-2065.

LOBO BEDMAR, M. C. 1985. Biodegradación y humificación del sarmiento de vid. Caracterización agrobiológica de los compost obtenidos. Memoria de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Madrid.

LOPEZ APARICIO, F. J., GARCIA GRANADOS LOPEZ DE HIERRO, A. & RODRIGUEZ ALONSO, M. 1977. Estudio del contenido en ácidos carboxílicos del alpechín de la aceituna y evolución de los mismos. *Grasas y Aceites*, 28: 393-401.

MARKAKIS, P. 1982. Stability of Anthocyanins in Foods. En Markakis, P. (ed.), *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 163-178. Academic Press, Londres.

MARTINEZ, J., PEREZ, J., MORENO, E. & RAMOS CORMENZANA, A. 1986. Incidencia del efecto antimicrobiano del alepchin en su posible aprovechamiento. *Grasas y Aceites*, 37: 215-223.

MARTON, J., STERN, A. M. & MARTON, T. 1969. Decolorization of kraft black liquor with *Poliporus versicolor*, a white-rot fungus. *Tappi*, 52: 1975-1980.

MILES, A.A. & MISRA, S. A. 1938. The estimation of the bactericidal power of blood. *J. Hygiene*, 38: 732-736.

MONICA, M. D., AGOSTIANO, A., POTENZ, D., RIGHETTI, E. & VOLPICELLA, M. 1980. Degradation treatment of waste water from olive processing. *Water Air Soil Pollut.* 13: 251-256.

MORENO, E. PEREZ, J., RAMOS CORMENZANA, A. & MARTINEZ, J. 1987. Antimicrobial effect of waste water from olive oil extraction plants selecting soil bacteria after incubation with diluted waste. *Microbios*, 51: 169-174.

MONTAÑO, J. & SEGURA, J. D. 1986. Compost production using vegetation water and other agricultural by-products. En FAO (ed.), International Symposium on Olive BY Products Valorization, pp. 359-361. Sevilla.

MORISOT, A. 1979. Utilisation des margines par épandage. L'Olivier, 19: 8-13.

MOTA, T. P. & FIGUEIRO, E. 1986. Current status of research in Portugal to better utilize olive vegetation. En FAO (ed.), International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 155-157. Sevilla.

MÜEZZINOGLU, A. & USLU, O. 1986. Alletion of pollution due to olive oil production some practical considerations from Turkey. En FAO (ed.), International Symposium on Olive BY Products Valorization, pp. 159-168. Sevilla.

NORRIS, J. R., BERKELEY, R. C. W., LOGAN, N. A. & O'DONNELL, A. G. 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. En Starr, Stolp, Truper, Balows and Shlegel (eds.), The Prokariotes, pp. 1711-1742. Springer, Verlag, Berlin.

OLANO, A. & HERNANDEZ, T. 1985. Study of the separation of low molecular weight phenolic compounds by HPLC and GLC. Bull. Liaison Groupe Polyphenols, 12: 591-593.

PAICE, M. G. & JURASEK, L. 1984. Peroxidase-catalysed color removal from bleach plant effluent. Biotechnol. Bioeng. 26: 477-483.

PAREDES, M. J., MONTEOLIVA-SANCHEZ, M., MORENO, E., PEREZ, J., RAMOS CORMENZANA, A. & MARTINEZ, J. 1986. Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere*, 15: 659-664.

PAREDES, M. J., MORENO, E., RAMOS CORMENZANA, A. & MARTINEZ, J. 1987. Characteristics of soil after pollution with waste waters from olive oil extraction plants. *Chemosphere*, 16: 1557-1564.

PEREZ, J. D., GALIARDO LARA, F & ESTEBAN, E. 1980. Aspectos a considerar en el empleo del alpechín como fertilizante. I. Evaluación de su efecto fitotóxico inhibidor de la germinación de semillas. *Cuad. Cien. Biol.* 6-7: 59-67.

PEREZ, J. D., ESTEBAN, E., GOMEZ, M. & GALLARDO LARA, F. 1986. Effects of waste water from olive processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. *J. Environ. Sci.* 21: 349-357.

POMPEI, C. & CODOVILLI, F. 1974. Risultati preliminari sui trattamento di depurazione delle acque di vegetazione delle olive per osmosis inversa. *Sci. Tecnol. Alimenti*, 4: 363-364.

POTENZ, D., RIGHETTI, E. & VOLPICELLA, M. 1980. Effetto inquinante delle acque reflue della lavorazione delle olive su terreno agrario. *Inquinamento*, 22: 66-68.

RAIMUNDO, M. C. & OLIVEIRA, J. S. 1976. Pollution from industrial extraction of olive oil in Portugal. In *Theory and Practice of Biological treatment*. Nato Advance Study Institute, Bogazici Univ, Estambul.

RAMOS CORMENZANA, A. 1979. Taxonomia Bacteriana, Universidad de Granada (ed.), Granada.

RAMOS CORMENZANA, A. 1986. Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. En FAO (ed.), International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 19-40. Sevilla.

RAMOS, J. L. & TIMMINS, K. N. 1987. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. Microbiol. Sci, 8: 228-237.

RAGAZZI, E., VERONESE, G. 1967. Ricerche sui costituenti idrosolubili delle olive. Nota I. Zuchero e fenoli. Ann. Chim, 57: 1386-1397.

RAGAZZI, E., VERONESE, G. & PIETROGRANDE, A. 1967. Ricerche sui costituenti idrosolubili delle olive. II. Pigmenti e polisaccaridi. Ann. Chim, 57: 1398-1413.

RAPER, K. B. & FENNEL, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. Willians and Willians, Baltimore.

RAPER, K. B. & THOM, C. 1949. A manual of the Penicillia, p. 875. Willians and Wilkins, Co, Baltimore.

RIDGNAY, H. F., KELLY, A. JUSTICE, C. & OLSON, B. H. 1983. Microbial fouling of reverse osmosis membranes used in advances wastewater treatment technology: chemical, bacteriological and ultrastructural analyses. Appl. Environ. Microbiol, 45: 1066-1084.

RODRIGUEZ, M. M., PEREZ, J., RAMOS CORMENZANA, A. & MARTINEZ, J. 1988. Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. J. Appl. Bacteriol. 64: 219-226.

ROSENBERGER, R. F. & ELSER, S. R. 1960. The yields of *Streptococcus faecalis* grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 22: 726-739.

ROSTON, D. A. & KISIGER, P. T. 1981. Identification of phenolic constituents in commercial beverages by LC with electrochemical detection. Anal. Chem. 53: 1695-1699.

SAINZ JIMENEZ, C. & GOMEZ ALARCON, G. 1986. Effects of vegetation water on fungal microflora. En FAO (ed.) International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 61-76.

SAINZ JIMENEZ, C., GOMEZ ALARCON, G. & DE LEEUW, J. W. 1986. Chemical properties of the polymer isolated in fresh vegetation water and sludge evaporation ponds. En FAO (ed.), International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 41-60, Sevilla.

SCHAEFFER, A. B. & FULTON, M. 1983. A simplified method of staining endospores. Science, 77: 194.

SLATER, J. H. & LOVATT, D. 1984. Biodegradation and the significance of microbial communities. En Gibson D. T. (ed.), Microbial Degradation of Organic Compounds, pp. 439-485, Marcell Dekker, Inc. New York.

SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., HOLT, J. G. (eds.). 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.

SPARNINS, V. L., CHAPMAN, P. J. & DAGLEY, S. 1974. Bacterial degradation of 4-hydroxyphenyl-acetic acid and homoprotocatechuic acid. *J. Bacteriol.* 120: 159-167.

SPENCER, J. F. T. & GORIN, P. A. J. 1971. Yeast isolated from soils of citrus orchards and citrus waste disposal areas in California and Florida: Flavonoid utilization. *Can. J. Microbiol.* 17: 871-877.

STARR, M. P., STOLP, H., TRÜPER, H. G., BALLOWS & SCHLEGEL, H. G. (eds.) 1981. *The Prokaryotes*. Springer Verlag, Berlin.

SUNDMAN, G., KIRK, T. K. & CHANG, H. M. 1981. Fungal decolorization of Kraft bleach plant effluent. Fate of the chromophore material. *Tappi.* 63: 145-152.

TIEN, M., KERSTEN, P. J. & KIRK, T. K. 1987. Selection and improvement of lignin-degradin microorganisms: potential strategy based on lignin model-amino acid adducts. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 53: 242-245.

TOND, T., TANI, Y. & ONO, K. 1968. Microbial treatment of agricultural waste, part I: adsorption of lignins and clarification of lignin containing liquor by mould. *J. Ferment. Technol.* 46: 569.

TORMO DIAZ, M. C., DIAZ RODRIGUEZ, R. & RAMOS CORMENZANA, A. 1979. Contribución al estudio de la posible descontaminación del alpechín por métodos microbiológicos. Resumen VIII COngreso Nacional de Microbiología, Cádiz.

TORRES MARTIN, M., ZAMORA ALONSO, M. A. & ESTEBAN VELASCO, E. 1980. Aspectos a considerar en el empleo del alpechín como fertilizante. II. Ensayos en macetas. An Edafol. Agrociol. 39: 1379-1384.

ULMER, D. C., LEISOLA, M. S. A. & FIETCHER, A. 1984. Possible induction of ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotech. 1: 13-24.

VACCARINO, C., LO CURTO, R., TRIPODDO, M. M., LAGANA, G. & PATANE, R. 1986. Vegetation water treatment by aerobic fermentation with fungi. En FAO (ed.), International Symposium on Olive By Products Valorization, pp. 147-154. Sevilla.

VALENZUELA RUIZ, G. 1986. Thermal concentration of vegetation water. En FAO (ed.), International Symposium on Olive BY Products Valorization, pp. 173-177. Sevilla.

VAZQUEZ RONCERO, A., MAESTRO DURAN, R. & GRACIANI CONSTANTE, E. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna. II. Polifenoles del alpechín. Grasas y Aceites. 25: 341-345.

VILCHEZ QUERO, A. 1982. Ecología de los ríos contaminados: la macroflora bentónica. Memoria de Doctorado, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada.

VITAGLIANO, M. 1975. Utilizzazione razionale delle acque di vegetazione delle olive. *OLI Grassi Derivati*, XI: 38-39.

WALTERS, E. H. 1917. The isolation of p-hydroxybenzoic acid from soil. *J. Am. Chem. Soc.* 39: 1978-1983.

WANG, T. S. C., YANG, T. K. & CHUANG, T. T. 1967. Soil phenolic acids as plant-growth inhibitors. *Soil Sci.*, 103: 239-246.

WITEHEAD, D. C. 1964. Identification of p-hydroxybenzoic, vanillic, p-coumaric and ferulic acids in soils. *Nature*, 202: 417.

