Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Facultad de Ciencias Médicas y Facultad de Ciencias Químicas
Córdoba (Capital), Argentina

DECONTAMINACIÓN DE EFLUENTES PROVENIENTES DEL PROCESAMIENTO DEL ACEITE DE OLIVA MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

LAURA ANDREA LOTO, Ing. Qca.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Director:
Dr. CELSO CLEMENTE CAMUSSO

2016

Universidad Nacional de Córdoba

Facultades de Ciencias Químicas, Ciencias Agropecuarias, Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y Ciencias Médicas

Córdoba (Capital), Argentina

Director:

Dr. CELSO CLEMENTE CAMUSSO

Comisión evaluadora de tesis:

Dr. Nelson Grosso

Dra. María Valeria Amé

Evaluador externo:

Dr. Marcelo Rosmini (Universidad Católica de Córdoba)

Dedicado a mi hijo Gabriel Tobías, a quien amo profundamente.
Esta tesis es un homenaje póstumo a mi madre quien hubiera querido verla concluida.

Agradecimientos

A Dios,

Al Profesor Dr. Celso C. Camusso, por su orientación y guía en la realización de la tesis y por brindarme esta oportunidad.

A las Ingenieras Graciela (Betty) Pergassere y María Eugenia Rodriguez por su gran ayuda material e intelectual, además de su calidez humana.

Al Dr. Nadir de la Rocha por su colaboración material, intelectual y anímica incondicional.

A las becarias y ayudantes ad-honorem de laboratorio que me eligieron para trabajar y fueron una asistencia muy valiosa en las distintas etapas de la parte experimental: Florencia Milanesio, Sofía Galliano y Natalia Cabrera.

A las Ingenieras Verónica Pavez y Lic. Alejandra Soloaga, quienes prestaron materiales para el desarrollo de la parte experimental.

A las Ingenieras Raquel Brito e Isabel Demaldé que, además de soportarme como amiga, le dedicaron el tiempo necesario para revisar y aportar a lo escrito, y además la primera en el tratamiento de las imágenes.

Al Ing. Claudio Nadal por brindarme su respaldo en la realización de esta maestría en el momento que le tocó ser Decano del Departamento de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

A la Universidad Nacional de La Rioja, por permitirme acceder a un lugar para la realización de este proyecto y utilizar sus equipos.

A la Universidad Nacional de Córdoba, en donde cursé los módulos de esta maestría.

Un agradecimiento a mi padre Eduardo, mis hermanos Paula y Eduardo, por ser mi refuerzo emocional.

Especialmente quiero agradecer a mi madre, Ida, quien siempre creyó que podía lograrlo, me enseñó a enfrentar mis miedos, perseverar y confiar en Dios. Ella es el ejemplo que inspira mi vida.

Tabla de contenidos

Resumen vi
Abstract viii
Lista de abreviaturas y símbolos x
Lista de ilustraciones xii
Lista de tablas xiv
Glosario xvi
Introducción 1
1. Marco Teórico 1
1.1 Tecnología del aceite de oliva 1
1.2 Composición del alpechín 4
1.3 Métodos de tratamientos de los residuos líquidos 9
1.4 Hongos basidiomicetos y enzimas lacasas 17
1.5 Planteamiento del problema 25
PARTE EXPERIMENTAL 27
2. Material y Metodología 27
2.1 Alpechín 27
2.1.1 Muestras 27
2.1.2 Tratamiento previo 27
2.2 Microorganismos empleados 27
2.2.1 Cepas de hongos utilizadas y condiciones de cultivos 27
2.2.2 Cultivos de mantenimiento 28
2.3 Valoración de la capacidad de expresión de enzimas por decoloración de colorante 28
2.4 Producción de enzimas en distintos medios 30
2.4.1 Medio de Kirk modificado 31
2.4.2 Medio de Czapek-Dox modificado 32
2.4.3 Medio sólido con ácido gálico 32
2.4.4 Medios con alpechín 34
2.4.4.1 Medio sólido con alpechín 34
2.4.4.2 Medio líquido con alpechín 35

2.5 Técnicas analíticas utilizadas 36
2.5.1 Determinación de color 36
2.5.2 Valoración de la actividad enzimática de lacasa 37
2.5.3 Determinación de los polifenoles totales 38
2.5.4 Fitotoxicidad 40
2.6 Análisis estadísticos 44
3. Resultados 44
3.1 Valoración de la capacidad de expresión de enzimas 44
3.1.1 Medio con ácido gálico 44
3.1.2 Medio con colorante Reactive Blue 220 47
3.2 Producción de lacasas en medios líquidos: medios de Kirk modificado y Czapek-Dox modificado 50
3.3 Producción de lacasas en medio con Agar-ácido gálico 54
3.4 Producción de lacasas en medios con alpechín 56
3.4.1 Medio sólido con alpechín 56
3.4.2 Medio líquido con alpechín 66
3.4.2.1 Determinación del color 67
3.4.2.2 Valoración de la actividad enzimática 68
3.4.2.3 Determinación de los polifenoles totales 70
3.4.2.4 Fitotoxicidad 71
3.4.2.5 Correlación de los parámetros analizados 72
4. Discusión 75
5. Conclusiones 79
6. Perspectivas futuras 79
7. Bibliografía 80

Resumen

La extracción de aceite de oliva es una de las actividades industriales, económicas y sociales más importantes de la provincia de La Rioja.

Esta industria, como toda actividad humana, genera desperdicios o efluentes. El alpechín es el residuo líquido que se genera principalmente como resultado de la obtención del aceite de oliva. La composición de este efluente presenta bajo contenido en materia inorgánica y alto contenido en materia orgánica. Incluido como materia orgánica se encuentra su alto contenido de polifenoles, quienes son los responsables del color oscuro característico y de su carácter fuertemente bactericida que inhabilita los tratamientos biológicos posteriores para la depuración y que elimina la imprescindible y necesaria flora bacteriana del suelo cuando se lo deposita directamente en él. Por todo ello, los alpechines no cumplen con la normativa para ser vertidos a la red de drenaje y saneamiento y tampoco pueden ser aprovechados para riego por su alta carga contaminante. En la provincia de La Rioja los efluentes de este tipo de industria se tratan en la actualidad en un 100 % en lagunas de evaporación que con el paso del tiempo el agua se evapora y los compuestos contaminantes se concentran o terminan colmándose debido a que su profundidad debe ser pequeña para forzar la evaporación.

En el presente trabajo se estudia una alternativa viable de biodegradación del alpechín mediante el tratamiento con las enzimas producidas por tres especies de hongos de pudrición blanca de la madera, fenol-oxidasas, de forma tal que pierda parcialmente su poder antimicrobiano y pueda ser vertido al medio ambiente.

Para ello, se cultivaron variedades de hongos de pudrición blanca de la madera *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* y *Phellinus rimosus*. Las enzimas producidas fueron fenol-oxidasas (lacasa) visualizadas por decoloración del colorante RBlue 220 y de un fenol (ácido gálico) en medios de cultivo sólidos. También se investigó la generación de enzimas de estos hongos en dos medios líquidos (de Kirk modificado y de Czapek-Dox modificado) con la finalidad de medir el tiempo de su máxima producción determinando la actividad enzimática. Se concluyó que no todas las cepas de hongos presentan el mismo comportamiento en los dos medios. Para *T. versicolor* y *T. villosa* les resultó más favorable el medio Czapek-Dox modificado y, en cambio, para *P. rimosus* el de Kirk modificado. En cuanto a los valores de

actividad enzimática máxima producida en estos medios, se pudo observar que los valores de *T. versicolor* y *T. villosa* son similares y muy superiores, entre un 16 a un 20 %, a los de *P. rimosus*. También se pudieron observar los tiempos de máxima producción de lacasa de las distintas cepas arrojando como resultado un mínimo de 24 días.

Con respecto al alpechín, se sembraron las tres cepas de hongos de la pudrición blanca de la madera seleccionadas en medios sólido y líquido siendo capaces de crecer en alpechín solidificado con agar y producir decoloración. En soluciones con diferentes concentraciones de efluente se determinaron, en cada caso al final del tratamiento, cuatro parámetros: decoloración, fitotoxicidad, reducción de concentración de polifenoles y actividad enzimática. En general se puede establecer que la concentración en donde las tres cepas pudieron crecer fue del 25 %; a otras concentraciones mayores se pudo observar un efecto inhibitorio, ya sea aumentando el período de latencia o directamente anulando el crecimiento.

Se observó una notable disminución de la fitotoxicidad y de la concentración de polifenoles, y un aumento de la actividad enzimática y de la decoloración en los alpechines tratados. Esto demuestra que el tratamiento del efluente con enzimas producidas por estos hongos es una alternativa de tratamiento de efluentes por sí misma o como una etapa de un proceso más complejo. Cada una de estas variedades presenta sus características de crecimiento y desarrollo pudiendo elegir entre ellas, una vez establecidas en este trabajo, para la posterior construcción de un bioreactor.

En cuanto al análisis de correlación lineal de Pearson llevado a cabo para las variables determinadas en el medio líquido de alpechín a las distintas concentraciones, se pudo observar solamente una alta correlación lineal inversa significativa de la decoloración relativa con la reducción de polifenoles para *P. rimosus*.

Palabras clave: enzimas ligninolíticas, alpechín, compuestos fenólicos, hongos de pudrición blanca, lacasas.

Abstract

The extraction of olive oil is one of the most important industrial, economic and social activities of La Rioja province.

This industry, like any human activity, generates waste or effluent. The olive mill wastewater (OMW) is the liquid waste that is generated as a result of obtaining olive oil. The composition of this effluent has low content of inorganic matter and high content in organic matter. As organic material is included its high content of polyphenols, which are responsible for the characteristic dark color and its strong bactericidal character that disables subsequent biological treatments for debugging and eliminating the essential and necessary bacterial flora of the soil when it is deposited directly on it.

Therefore, the OMW not compliant to be discharged into the drainage and sanitation pipes, and indeed can be harnessed for irrigation for its high pollution load. In La Rioja province effluents from this industry are treated today by 100 % in the aforementioned evaporation ponds that over time the water evaporates and the pollutants compounds are concentrated or end filling up because its depth should be small to force evaporation.

In this work a viable alternative biodegradation of OMW is studied by treatment with those enzymes produced by three species of white rot fungi of wood, phenol oxidase enzymes, so that OMW partially lose its antimicrobial power and can be discharged to environment.

To do this, varieties of white rot fungi of wood *Trametes villosa*, *Phellinus rimosus* *Trametes versicolor* were cultured.

The enzymes produced were phenol oxidases (laccases) visualized by dye fading RBlue 220 and gallic acid in solid culture media.

Also, these fungi were grown in two liquid media (modified Kirk and modified Czapek-Dox) in order to measure the time of enzyme maximum production determining enzyme activity. It was concluded that not all fungal strains exhibit the same behavior in the two media. For *T. versicolor* and *T. villosa* find it more favorable modified Czapek-Dox culture media and, instead, to *P. rimosus* is the modified Kirk.

For *T. versicolor* and *T. villosa* the maximum enzymatic activity values are similar, and higher, between 16 to 20 %, to *P. rimosus*. The peak of higher production of laccase, of various strains fungi, was observed after 24 days.

Regarding the OMW, the three strains of white rot fungi were able to grow on agar solidified OMW and cause discoloration.

In solutions with different OMW concentrations, at the end of treatment, discoloration, phytotoxicity, remaining polyphenols and enzyme activity were determined.

In general it can be established that the three strains were able to grow where the OMW concentration was 25 %. At higher OMW concentrations an inhibitory effect was observed, either increasing the latency period or directly canceling growth.

Results in significant decrease in phytotoxicity, polyphenol concentration, increased enzymatic activity and discoloration of treated OMW was observed. This shows that the treatment of effluent with enzymes produced by these fungi is an alternative for effluent treatment by itself or as a step in a more complex process. Each of these fungi has its characteristics of growth and development choosing between them, once established in this work, for the subsequent construction of a bioreactor.

It could only observe a significant high linear reverse correlation between discoloration of OMW and reduction of polyphenols content for *P. rimosus* using linear correlation of Pearson carried out in the liquid medium of OMW to various concentrations.

Keywords: ligninolytic enzymes, olive mill wastewater (OMW), phenolic compounds, white rot fungi, laccases.

Lista de abreviaturas y símbolos

AG: Medio compuesto por Agar y ácido gálico

ANAVA: Análisis de la Varianza

AOCS: Association of the Official Analytical Chemist's

cm: centímetro

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno

DBO_5 (g/L): Demanda Biológica de Oxígeno expresada en gramos por litro, determinada a los 5 días.

DQO: Demanda Química de Oxígeno

dS/m: deciSiemens por metro

E°: potencial estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

g/cm^3: gramo por centímetro cúbico

kg: kilogramo

L: litro

m: metro

MA: medio compuesto por extracto de Malta y Agar

mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MMM: medio mínimo de mantenimiento

mU: miliunidades de actividad enzimática

mV: milivoltio

nm: nanómetro

NTA: ácido nitrilotriacético

SM: medio sólido

ST: sólidos totales

UV: luz ultravioleta

VIS: luz visible

°C: grado centígrado

µ: micro

µg: microgramo

µL: microlitro

µm: micrómetro

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Proceso general de obtención de aceite de oliva 2
Ilustración 2. Prensado tradicional para la producción de aceite de oliva 3
Ilustración 3. Centrifugación moderna (decantador de tres fases) para la producción de aceite de oliva 3
Ilustración 4. Fotografías de lagunas de evaporación de efluentes de fábricas de aceite ubicadas en la provincia de La Rioja. 10
Ilustración 5. Esquema de una reacción típica de lacasa 22
Ilustración 6. Las tres cepas de hongos trabajadas en este estudio. De izquierda a derecha: *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* y *Phellinus rimosus* 28
Ilustración 7. Placa de Petri con el medio con colorante RBlue 220. A: anverso, B: reverso con las dimensiones trazadas para la medición 29
Ilustración 8. Placa de Petri con el medio AG. A: anverso, B: reverso con las dimensiones trazadas para la medición 33
Ilustración 9. Una de las curvas temporales obtenidas con *T. versicolor* en medio Czapek-Dox modificado 37
Ilustración 10. Reacción de Folin-Ciocalteau en las soluciones de ácido gálico para la construcción de la curva de calibración 39
Ilustración 11. Ensayo de fitotoxicidad 41
Ilustración 12. Montaje de las semillas en las placas de Petri 42
Ilustración 13. Semillas de *Lactuca sativa* germinadas 43
Ilustración 14. Proceso de medición 43
Ilustración 15. Porcentaje de relación halo/colonia en medio AG 45
Ilustración 16. *Trametes villosa* en medio AG 46
Ilustración 17. *Trametes versicolor* en medio AG. A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 4 46
Ilustración 18. *Phellinus rimosus* en medio AG. A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 4, E: Día 5, F: Día 6, G: Día 8, H: Día 23 47
Ilustración 19. Porcentaje de relación halo/colonia en medio con colorante Reactive Blue 220 48
Ilustración 20. *Trametes villosa* en medio con el colorante Reactive Blue 220 49
Ilustración 21. *Trametes versicolor* en medio con el colorante Reactive Blue 220 49
Ilustración 22. *Phellinus Rimosus* en el medio con colorante Reactive Blue 220. A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 4, E: Día 5, F: Día 6, G: Día 8 50
Ilustración 23. Hongos cultivados en medio líquido Kirk modificado 50
Ilustración 24. Hongos cultivados en medio líquido Czapek-Dox modificado 51
Ilustración 25. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de *Trametes villosa* vs. tiempo de producción 53
Ilustración 26. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de *Trametes versicolor* vs. tiempo de producción 53

Ilustración 27. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de *Phellinus rimosus* con el tiempo de producción.....54
Ilustración 28. Crecimiento del diámetro en función de los días en medio AG-agar 55
Ilustración 29. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo a una concentración de alpechín del 25 % 58
Ilustración 30. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo a una concentración de alpechín del 50 % 58
Ilustración 31. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo a una concentración de alpechín del 75 % 59
Ilustración 32. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo de *Trametes villosa* a las distintas concentraciones de alpechín.....61
Ilustración 33. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo de *Trametes versicolor* a las distintas concentraciones de alpechín.....61
Ilustración 34. Decoloración (%) vs. concentración (%) de alpechín a las dos longitudes de onda ensayadas, 395 y 525 nm.....64
Ilustración 35. Patrones de decoloración de las tres cepas ensayadas en alpechín al 25 %. A) *Trametes villosa*, B) *Trametes versicolor*, C) *Phellinus Rimosus* 64
Ilustración 36 Crecimiento y decoloración de *Trametes villosa* a tres concentraciones de alpechín con el 11,5 % de agar.....65
Ilustración 37. Diámetro de crecimiento vs. tiempo a distintas concentraciones de alpechín para todas las cepas y para la cepa de *Trametes villosa* datos con el 11,5 % de agar.....66
Ilustración 38. Medio líquido con alpechín a distintas concentraciones 67
Ilustración 39. Decoloración relativa (%) en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para los tres hongos ensayados a los 28 días de crecimiento.....68
Ilustración 40. Actividad enzimática en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para los tres hongos ensayados a los 28 días de crecimiento.....69
Ilustración 41. Reducción relativa (%) de la concentración de polifenoles en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para los tres hongos ensayados a los 28 días de crecimiento.....70
Ilustración 42. Fitotoxicidad referida como Índice de germinación de la semilla de *Lactuca sativa* en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín tratado con las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. 72

Lista de tablas

Tabla 1. Denominación del residuo resultante de los diferentes procesos de extracción de aceite 4
Tabla 2. Resumen de los constituyentes del agua residual del aceite de oliva (alpechín) de acuerdo con diferentes datos de la bibliografía 7
Tabla 3. Comparación de los valores de composición del agua residual del aceite de oliva de una planta de extracción pequeña (A), de una planta grande (B) con los límites máximos de la normativa sobre agua residual vigentes en la provincia de La Rioja (C) 9
Tabla 4. Métodos de tratamiento del residuo líquido (alpechín) en la producción de aceite de oliva 12
Tabla 5. Composición del medio sólido con colorante Reactive Blue 220 30
Tabla 6. Composición del medio de Kirk modificado 31
Tabla 7. Composición de la solución de micronutrientes o elementos traza 31
Tabla 8. Composición del medio de Czapek-Dox modificado 32
Tabla 9. Composición del medio sólido con Agar-ácido gálico (AG) 33
Tabla 10. Composición del Medio Mínimo de Mantenimiento (MMM) 35
Tabla 11. Porcentaje de relación halo/colonia de las 3 cepas de hongos ensayadas en medio AG. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 45
Tabla 12. Porcentaje de relación halo/colonia de las 3 cepas de hongos ensayadas en medio con colorante Reactive Blue 220. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 47
Tabla 13. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de las 3 ceás de hongos ensayadas en los medios de Kirk modificado y Czapek-Dox modificado. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 52
Tabla 14. Crecimiento del diámetro en función de los días en medio AG-agar de las 3 cepas de hongos ensayadas. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 55
Tabla 15. Crecimiento del diámetro del micelio en función de los días en medios con concentraciones de alpechín del 25, 50 y 75 % de las 3 cepas de hongos ensayadas. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 57
Tabla 16. Velocidades de crecimiento lineal del micelio (mm/día) para las 3 cepas de hongos ensayadas que crecen en MA, AG y sobre sustratos a base de medios de agar-diluciones de alpechín en diferentes concentraciones. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 60
Tabla 17. Decoloración relativa (%) en sustrato de agar con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 5-7 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 63
Tabla 18. Velocidad de crecimiento miceliar para *Trametes villosa* a distintas concentraciones de alpechín y porcentaje de agar. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 66

Tabla 19. Decoloración relativa (%) en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 67
Tabla 20. Actividad enzimática (U/L) en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 69
Tabla 21. Reducción relativa (%) de la concentración de los polifenoles totales en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 70
Tabla 22. Fitotoxicidad referida como Índice de germinación de la semilla de *Lactuca sativa* en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín tratado con las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 71
Tabla 23. Resultados obtenidos para los parámetros analizados a diferentes concentraciones de alpechín tratado con *Trametes villosa*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 73
Tabla 24. Resultados obtenidos para los parámetros analizados a diferentes concentraciones de alpechín tratado con *Trametes versicolor*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 73
Tabla 25. Resultados obtenidos para los parámetros analizados a diferentes concentraciones de alpechín tratado con *Phellinus rimosus*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3 73
Tabla 26. Coeficientes de correlación de Pearson (R) y sus valores de significancia (p-valor) para *Phellinus rimosus,* n= 3.....74
Tabla 27. Coeficientes de correlación de Pearson (R) y los valores de significancia (p-valor) para *Trametes versicolor,* n= 3.....74
Tabla 28. Coeficientes de correlación de Pearson (R) y los valores de significancia (p-valor) para *Trametes villosa,* n= 3.....74

Glosario

Alpechín: residuo líquido de los decantadores de tres fases y de las prensas, en la obtención del aceite de oliva.

Alpeorujo/orujo de dos fases: residuo sólido muy húmedo de los decantadores de dos fases, en la obtención del aceite de oliva.

CCC31: significa la procedencia CXX Culture Collection. Es el código de colección.

Conductividad eléctrica: es la medida de la capacidad (o de la aptitud) de un material para dejar pasar (o dejar circular) libremente la corriente eléctrica.

Contaminante: se define como una sustancia extraña, presente en un sistema natural en una concentración más elevada de lo normal por causa de actividad antrópica directa o indirecta. También se lo define como la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, en lugares, formas, concentraciones y con una persistencia que sean nocivos para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o perjudiciales para la vida animal y vegetal.

DBO_5: es la cantidad de oxígeno requerido por un inóculo de bacterias para la descomposición de la materia orgánica en una muestra, durante 5 días a una temperatura de 20 °C (mg/L).

DQO: es la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación completa de la materia orgánica por agentes químicos altamente oxidantes como el Permanganato de Potasio, en una ambiente altamente ácido.

Escorrentía: es un término geológico de la hidrología, que hace referencia a la lámina de agua que circula sobre la superficie en una cuenca de drenaje, es decir la altura en milímetros del agua de lluvia escurrida y extendida.

Esterilización: destrucción o eliminación de cualquier forma de vida. Comprende a aquellos tratamientos que dejan al objeto tratado libre de todo organismo vivo.

Germinación: se refiere al crecimiento del embrión de una semilla una vez superado el periodo de latencia y cuando las condiciones de temperatura, luz, disponibilidad de oxígeno y agua son las adecuadas, se desarrolla la plántula y da comienzo el ciclo de vida.

Hipocótilo: porción del tallo de un embrión o de la plántula situado entre los cotiledones y la radícula.

Inocular: proviene del latín inoculare y significa injertar. También se puede utilizar este término para referirse a la implantación de microorganismos o material infeccioso a un medio de cultivo.

***Lactuca sativa* L. (Lechuga)**: planta herbácea hortícola, propia de las regiones templadas, comestible que tiene una alta sensibilidad a la presencia de agentes extraños.

Orujo/orujo de tres fases: residuo sólido húmedo de los decantadores de tres fases y de las prensas, en la obtención del aceite de oliva.

Radícula: extremo basal del eje embrionario, raíz originada en la semilla y que dará la raíz primaria.

Sinónimos de Reactive Blue 220: Remazol Brilliant Blue BB; Remazol Brilliant Blue BB-ID; Sunzol Brilliant Blue BB.

Tóxico: sustancia química que dependiendo de la concentración y tiempo de exposición produce alteraciones bioquímicas, fisiológicas, estructurales o la inhibición del organismo expuesto.

Introducción

La extracción del aceite de oliva representa una actividad industrial, económica y social que es altamente relevante en la provincia de La Rioja. El desarrollo y crecimiento de la producción olivícola en esta provincia se debe en gran medida a la implementación de la Ley de Diferimientos Impositivos – Ley 22.021 – sancionada en los años ´70 y que adquiere para este sector una mayor relevancia en la década del 90. Esta ley contempla que empresas de cualquier sector puedan diferir el pago de impuestos nacionales durante un período determinado, utilizando ese monto para realizar inversiones en el sector agropecuario. En la plantación de olivos el lapso es de 16 años, después de los cuales comienza la devolución sin intereses.

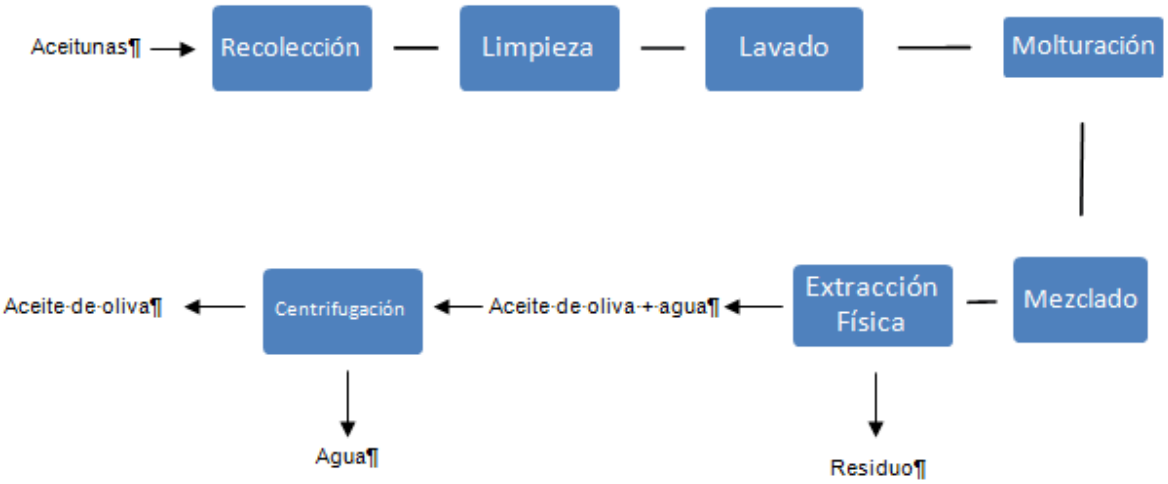
La superficie plantada con olivos en la Provincia de La Rioja sufrió un incremento de 2036 ha (10 % del total en Argentina) a 20503 ha (28 % del total, de acuerdo a lo informado por los Censos Nacionales Agropecuarios de 1988 y 2002(Rofman & Vázquez Blanco), alcanzando una superficie de 30.000 hectáreas en el año 2012 (MAGPyA, 2004 y Searles, 2012, como son citados por Esteva, 2014). En el 2007 la producción estuvo en 97.675 toneladas, cuyo destino fue 43 % a conserva y 57 % para aceite de oliva (Cáceres, Novello, & Robert, 2009).

1. Marco Teórico

1.1 Tecnología del aceite de oliva

La tecnología usada generalmente para producir aceite de oliva se esquematiza en la Ilustración 1.

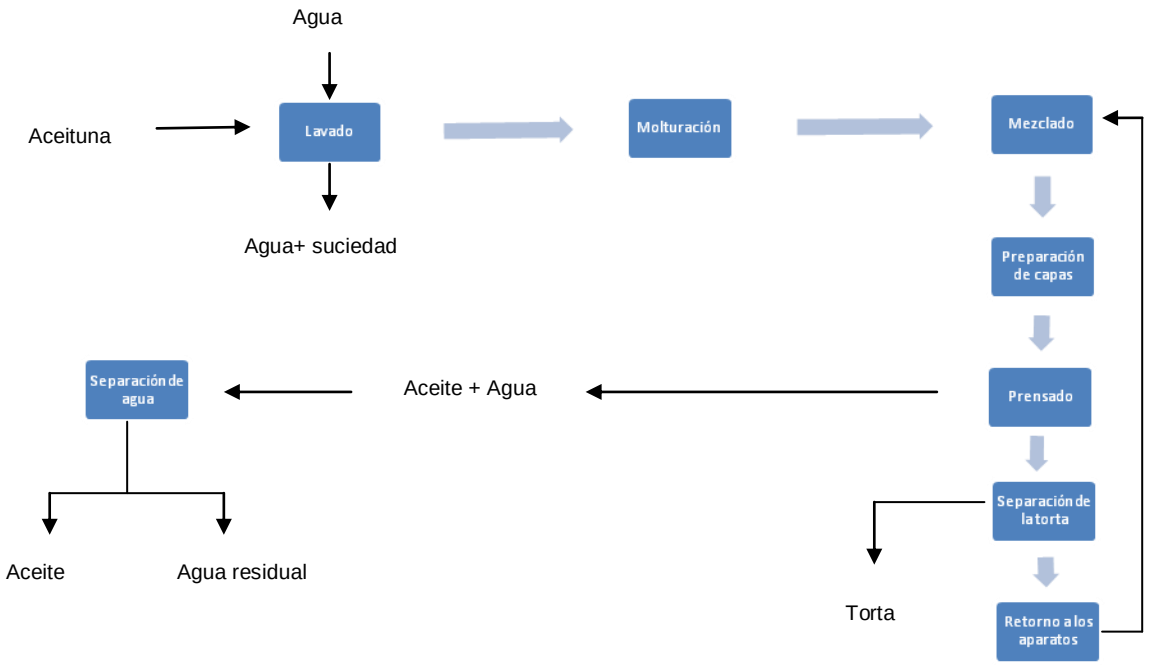
Ilustración 1. Proceso general de obtención de aceite de oliva



Fuente: Tomado y modificado de Awad, Salman, & Hung, 2006.

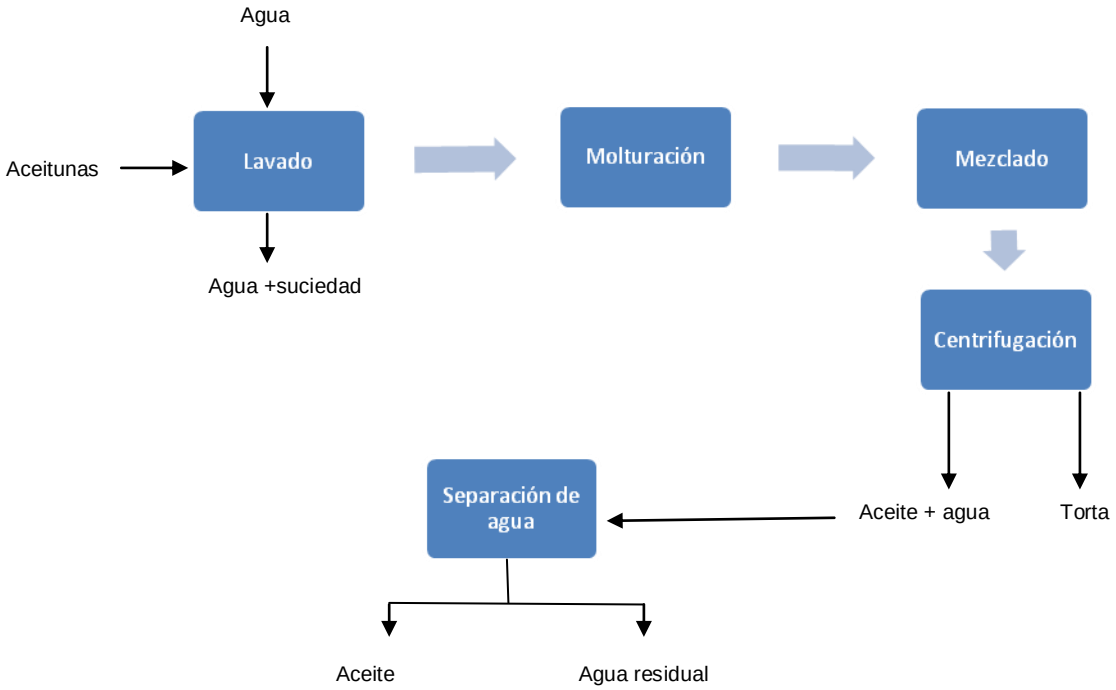
Primero las aceitunas se lavan para eliminar las impurezas físicas tales como hojas, trozos de madera y pesticidas. Después, las mismas se muelen y se mezclan en forma de pasta (molturación y mezclado). La etapa de molturación o molienda se realiza con algún tipo de molino, los más utilizados son los de piedras o de ruedas dentadas. La etapa de mezclado se lleva a cabo en una termobatidora. La siguiente etapa puede realizarse a través de dos sistemas de extracción: prensado tradicional o centrifugado moderno. En las Ilustraciones 2 y 3 se esquematizan los dos sistemas. Ambas técnicas generan una corriente de aceite de oliva y dos corrientes de residuos, un residuo acuoso denominado alpechín y otro sólido y húmedo denominado orujo. Un nuevo procedimiento de centrifugación moderna, distinto del anterior de tres fases, es el llamado decantación de dos fases. El diagrama es muy similar al que se muestra en la Ilustración 3, con la diferencia que este método en la centrifugación produce una corriente de aceite de oliva casi sin agua y una corriente de residuo formado por un sólido muy húmedo denominado alpeorujo (agua + orujo).

Ilustración 2. Prensado tradicional para la producción de aceite de oliva



Fuente: Tomado de Awad, Salman, & Hung, 2006.

Ilustración 3. Centrifugación moderna (decantador de tres fases) para la producción de aceite de oliva



Fuente: Tomado de Awad, Salman, & Hung, 2006.

En la Tabla 1 se resume los efluentes que se generan, de acuerdo al proceso de obtención utilizado para el aceite de oliva, y las diferentes denominaciones que reciben.

En el mundo entero, se está en proceso de reconversión del sistema de prensado por el sistema de centrifugado más moderno, de decantación en dos fases, que garantiza el procesamiento en menor tiempo.

Además, a diferencia de los procesos con decantador en tres fases, el decantador en dos fases no necesita la adición de agua a las aceitunas molidas. El decantador en tres fases requiere de hasta 50 kg de agua por cada 100 kg de pulpa de oliva con el fin de separar esta última en tres fases: aceite, agua y una suspensión de sólidos. Esto es necesario, ya que se debe formar una capa de agua sin enlaces con el aceite y la fase sólida en el interior del decantador. De este modo, se pueden producir hasta 60 kg de alpechín por cada 100 kg de olivas.

De acuerdo a lo expuesto por Awad, Salman y Hung (2006), el alpeorujo (residuo sólido/líquido) tiene un contenido en humedad del 60-65 % a la salida del decantador mientras que el contenido en humedad del residuo sólido utilizando el decantador de tres fases es de aproximadamente el 50 %, y por prensado tradicional de alrededor del 25 %. Un inconveniente es que el alpeorujo de dos fases es más difícil de almacenar debido a su humedad.

Tabla 1. Denominación del residuo resultante de los diferentes procesos de extracción de aceite

Residuo	**Prensado**	**Decantación en tres fases**	**Decantación en dos fases**
Sólido	Orujo	Orujo	Alpeorujo
Agua residual	Alpechín	Alpechín	-
Aceite (de la eliminación de aceite del residuo sólido)	-	Orujoaceite	Orujoaceite

Fuente: Tomado de Awad, Salman, & Hung, 2006.

1.2 Composición del alpechín

Los residuos líquidos son los principales subproductos y desechos generados en el proceso de extracción de aceite de oliva. Entre estos residuos se incluyen aguas de

lavado del fruto, de escurrido de las tolvas de almacenaje, de vegetación de la propia aceituna, de limpieza del aceite y agua añadida al proceso.

El contenido orgánico varía notablemente a lo largo de la campaña en función de diversos factores (climáticos, geográficos, edad del árbol, variedad de aceituna, etc.). El contenido inorgánico también puede variar manteniéndose como suspensión estable, inestable o semiestable, dependiendo de la forma de la recolección y de la climatología. Podemos dividir a los efluentes líquidos en dos tipos: el efluente procedente de las lavadoras de aceitunas y el efluente procedente de la extracción propiamente dicha del aceite. El primero tiene una composición con alto contenido en materia inorgánica (tierra) y bajo contenido en materia orgánica. Es un efluente muy variable en cuanto al caudal producido, ya que dependiendo de la suciedad que contenga la aceituna, se renueva el agua con más o menos frecuencia en la lavadora. Este aspecto está muy relacionado con la caída de aceituna al suelo por cuestiones climáticas o incluso por determinadas prácticas de recolección. Se pueden considerar volúmenes de vertido normales de 20 L a 100 L de agua por cada 100 kg de aceituna lavada. El segundo tipo de efluente, derivado de la extracción de aceite, incluye las aguas procedentes del lavado del aceite en centrífuga vertical, descargas de limpieza de este equipo, aguas procedentes del lavado del aceite en centrífugas horizontales ó “decanters” en sistemas de tres fases, escorrentías de tolvas, operaciones de limpieza en general, etc. Este último efluente es denominado alpechín. Los valores previsibles de caudal de este tipo de efluente son de 20-25 L por cada 100 kg de aceituna molida (Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, 2011a).

El alpechín es el residuo líquido de la extracción de aceite de oliva con valores previsibles de 20-25 L de efluente por cada 100 kg de aceituna molida.

La composición de estas aguas residuales presenta distintas características según la variedad de aceituna, su maduración, el clima, las condiciones del suelo y el método de extracción del aceite. A pesar de esto, se puede decir que el alpechín presenta bajo contenido en materia inorgánica y alto contenido en materia orgánica, lo que favorece el proceso de fermentación. Este contenido en materia orgánica se caracteriza por altos valores que alcanza en los parámetros de Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), además de por su

alta relación DQO/DBO (2,05-2,35). Así, los valores de DQO oscilan entre 39.900 y 210.000 mg/L y los de de DBO entre 9.600 y 150.000 mg/L (Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, 2011a). Las concentraciones medias de sólidos volátiles y materia inorgánica son 15 % y 2 % respectivamente (Di Giovacchino, Mascolo, & Seghetti, 1988), su pH es bajo (4,5-6,0) y su conductividad eléctrica es muy elevada (35.000-100.000 dS/m) (Benitez, Beltrán-Heredia, Torregosa, Acero, & Cercas, 1997). Respecto al tipo de materia orgánica, Beltrán de Heredia Alonso, Torregrosa Antón, & García Rodríguez (2000) describen que incluye azúcares, taninos, polifenoles, polialcoholes, pectinas y lípidos. Estos efluentes poseen un carácter recalcitrante para su autodepuración debido a su elevado contenido en compuestos fenólicos de alta capacidad biocida (Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos, 1992). Las altas concentraciones de polifenoles libres (3.000-24.000 mg/L) que presentan provienen de la hidrólisis de los glucósidos de la pulpa de la aceituna que ocurre durante la extracción del aceite. Parte de estos polifenoles, especialmente los o-difenoles, son oxidados y polimerizados por la enzima polifenoloxidasa, muy abundante en la pulpa de la aceituna (Maestro Durán, Borja Padilla, Martín Martín, Fiestas Ros de Ursinos, & Alba Mendoza, 1991).

En la Tabla 2 se puede observar un resumen de los constituyentes de los alpechines informados por distintos autores.

Tabla 2. Resumen de los constituyentes del agua residual del aceite de oliva (alpechín) de acuerdo con diferentes datos de la bibliografía

Parámetro	Beltrán de Heredia Alonso, Torregrosa Antón, & García Rodríguez, 2000	Borja Padilla, Alba Mendoza, & González Becerra, 1992	Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos, 1992	Di Giovacchino, Mascolo, & Seghetti, 1988		Fiestas, Martin, & Borja, 1990	Montedoro, Bertuccioli, & Petruccioli, 1975	Andreozzi, Longo, Majone, & Modesti, 1998
				Proceso por presión	Proceso por centrifugado			
pH	4,84	4,8	5,26	5,27	5,23	5,2	-	5,09
DQO (g/L)	95	70	212,25	146	85,7	60	-	121,8
DBO_5 (g/L)	52	-	179,45	-	-	-	-	
ST (g/L)	130,3	40,9	55,59	129,7	61,1	97,2	-	102,5
Sólidos orgánicos totales (g/L)	-	38,3	44,46	-	-	83,8	-	
Grasas (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	9,8
Polifenoles (g de ácido cafeico/L)	1,50	1,48	-	6,20	2,70	5,00	6,22	6,20
Ácidos orgánicos volátiles (g/L)	-	0,3	-	-	-	0,34	-	-
Nitrógeno total (g/L)	0,39	1,60	-	-	-	-	-	0,95

DQO: Demanda química de oxígeno; DBO_5: Demanda bioquímica de oxígeno en 5 días; ST: Sólidos totales.

De todos los elementos contaminantes contenidos en estas aguas, los azúcares, sustancias nitrogenadas, ácidos orgánicos y polialcoholes son productos que sufren en mayor o menor medida una degradación relativamente rápida en la naturaleza, pudiendo ser absorbidos por el medio pero no ocurre lo mismo con los polifenoles y grasas (Ehaliotis, Papadopoulos, Kotsou, Mari, & Balis, 1999; González, Moreno, Quevedo-Sarmiento, & Ramos-Cormenzana, 1990; Morisot & Tournier, 1986). Se ha publicado que estos compuestos fenólicos inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos, particularmente las bacterias (Paredes, Monteoliva-Sanchez, Moreno, Perez, Ramos-Comenzana, & Martinez, 1986; Rodriguez, Perez, Ramos-Cormenzana, & Martinez, 1988) y son la causa principal, junto con los ácidos grasos, de la toxicidad metanogénica del alpechín (Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis, 1997).

Los polifenoles, además, son los responsables del característico olor y color de los alpechines, que son líquidos acuosos de colores oscuros, hediondos y turbios, y de que contengan grasas emulsionadas (Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, 2011a).

El característico color marrón oscuro de estos efluentes es debido a la polimerización de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y a que están químicamente relacionados con derivados de lignina. El color, por lo tanto, es un monitor de descontaminación debido a que la decoloración del alpechín significaría la eliminación de gran parte de los compuestos fenólicos y sus propiedades contaminante (Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis, 1997).

Se ha estudiado la toxicidad de fenoles y taninos (fenoles polimerizados) para las bacterias metanogénicas en la depuración anaerobia de las aguas residuales de la industria del almidón a partir de papas, donde son muy abundantes dos compuestos fenólicos, la tirosina y la hidroxitirosina (Field, Lettinga, & Geurts, 1987), en las aguas residuales de la fabricación de coque, en las que hay altas concentraciones de fenol, m- y p-cresol y en las industrias papeleras que, entre otras sustancias altamente contaminantes, tienen dos de naturaleza fenólica, el guayacol y el eugenol (Benjamin, Wood, & Ferguson, 1984). Como la misión principal de los compuestos fenólicos en las plantas es inhibir a los microorganismos patógenos; no es de extrañar, por lo tanto, que sean tóxicos, por lo menos a concentraciones elevadas,

para las bacterias que realizan la depuración (Rodríguez, Pérez, Ramos Cormazana, & Martínez, 1988). El efecto inhibidor sobre las bacterias metanogénicas depende del sustrato, del tipo de bacterias y de otros factores, como el pH del medio. En general, es mayor la toxicidad cuando éste es ácido, como es el caso del alpechín.
Dependiendo en qué momento de la campaña se obtiene el alpechín, la cantidad en compuestos fenólicos puede variar. Así el contenido de fenoles decrece durante la maduración de la aceituna (Maestro Durán, Borja Padilla, Martín Martín, Fiestas Ros de Ursinos, & Alba Mendoza, 1991). Por otro lado, Di Giovacchino, Mascolo y Seghetti (1988) concluyen que el contenido de polifenoles en el alpechín depende también del método de extracción.

1.3 Métodos de tratamientos de los residuos líquidos

Los alpechines no cumplen con la normativa (Anexo I) para ser vertidos a la red de drenaje y saneamiento, tampoco pueden ser aprovechados para riego por su alta carga contaminante (Tabla 4 y Anexo I). En la Tabla 3 se muestran los valores de composición del agua residual de plantas de extracción de aceite de oliva y se los compara con los límites máximos de la normativa sobre agua, vigente en la provincia de La Rioja.

Tabla 3. Comparación de los valores de composición del agua residual del aceite de oliva de una planta de extracción pequeña (A), de una planta grande (B) con los límites máximos de la normativa sobre agua residual vigentes en la provincia de La Rioja (C)

Parámetro	Fuente del residuo líquido		
	A*[1]	B*[1]	C*[2]
pH	4,5-5,3	5,3-5,7	5,5 < pH < 10
DQO (g/L)	37-150	30-80	< 0,2
DBO_5 (g/L)	15-65	17-41	< 0,7
ST (g/L)	24-115	19-75	0,25
Fenoles	0,4-7,1[a]		< 0,005
Grasas y aceites (g/L)	0,046-0,76	0,1-8,2	0,1
Nitrógeno total (g/L)	0,27-0,51	0,3-0,48	< 0,105

[a]Método de centrifuga sin especificación de tamaño.

Fuentes: *[1] Awad, Salman, & Hung, 2006; *[2] Anexo I

Actualmente, la tendencia es el almacenamiento en lagunas de evaporación (Ilustración 4), pero con el paso del tiempo, el agua se evapora y los compuestos contaminantes se concentran. Además, estas lagunas terminan colmándose debido

a que la profundidad de las mismas debe ser pequeña para forzar la evaporación. En algunas plantas de extracción de aceite se están instalando aspersores que dispersan el agua en pequeñas gotas para que la evaporación sea más rápida, evitando así la construcción de nuevas lagunas de evaporación(Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, 2011b).

En la provincia de La Rioja los efluentes de este tipo de industria se tratan en la actualidad en un 100 % en lagunas de evaporación.

Ilustración 4. Fotografías de lagunas de evaporación de efluentes de fábricas de aceite ubicadas en la provincia de La Rioja.

Fuente: Gentileza del Ing. Ernesto Rodriguez

En otros lugares del mundo, como por ejemplo en España, para resolver dicha contaminación se han puesto en práctica diversos procesos que abarcan desde la simple evaporación hasta procesos físico-químicos como la ósmosis inversa y ultrafiltración pasando por procesos microbiológicos anaerobios. Todos ellos exigen

alta inversión y suponen una difícil amortización dado el carácter estacional de la industria olivícola (Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos, 1992).

El tratamiento biológico (principalmente aeróbico) es la opción preferida para el tratamiento de efluentes urbanos e industriales debido a su relativo costo-efectividad y aplicabilidad para tratar una amplia variedad de sustancias peligrosas. Las dificultades del tratamiento de los alpechines están asociadas principalmente con:

a) alta carga orgánica, con DQO de hasta 220 g/L y a veces alcanzando los 400 g/L;
b) operación estacional, que requiere almacenamiento;
c) alta dispersión territorial; y
d) presencia de compuestos orgánicos que son difíciles de degradar por los microorganismos (ácidos grasos de cadena larga y compuestos fenólicos) (Awad, Salman, & Hung, 2006).

Un resumen de los métodos utilizados para el tratamiento del residuo líquido de la producción del aceite de oliva se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Métodos de tratamiento del residuo líquido (alpechín) en la producción de aceite de oliva

Métodos primitivos de bajo costo	Métodos modernos
Drenaje en el suelo. Eliminación simple en estanque o laguna de evaporación. Mezclado con residuo sólido en vertederos sanitarios.	Tratamiento aeróbico Tratamiento anaeróbico Métodos combinados de tratamiento biológico Oxidación húmeda con aire y ozonización Tratamiento fúngico Decoloración Precipitación/floculación Adsorción Filtración (biofiltración, ultrafiltración) Evaporación/secado Electrólisis Biorremediación y compostaje [a] Alimentación de ganado [a] Desagüe submarino

[a] Estos métodos de reciclaje se pueden utilizar para residuos líquidos así como para residuos sólidos en la producción de aceite de oliva. Los productos resultantes del tratamiento se pueden reutilizar, por ejemplo, como fertilizante o forraje en agricultura. Para todos los métodos, el residuo que no es adecuado para su reutilización se puede desechar en vertederos.

Fuente: Awad, Salman, & Hung, 2006.

En el listado de la Tabla 4 se encuentran los métodos correspondientes a las tecnologías de vanguardia y que son viables económicamente (Awad, Salman, & Hung, 2006). En la práctica, estos procesos se emplean combinados uno con otro porque sus efectos difieren ampliamente.

A continuación se describen las etapas que contienen actualmente los tratamientos convencionales de depuración de aguas susceptibles de aplicación al sector oleícola, de acuerdo a lo informado por el Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación (2011a):

1. *Pretratamiento:* es la etapa en donde se llevan a cabo las primeras acciones necesarias para el tratamiento de los efluentes residuales. Ésta tiene como misión principal eliminar del agua residual todos aquellos elementos (sólidos gruesos, arenas, aceites y grasas) que puedan afectar al correcto funcionamiento de los tratamientos posteriores. Esta etapa, en la industria olivícola, se puede suprimir, ya que el agua a tratar no suele presentar materia de gran tamaño que

necesite un desbaste y por otro lado el contenido de tierra o arenas, aceites y grasas es muy bajo.

2. *Tratamientos primarios:* consisten en la separación de sólidos y líquidos suspendidos no retenidos en el tratamiento previo. Pueden incluir las siguientes operaciones:
   - *Decantación primaria:* tratamiento físico de separación sólido-líquido, en el cual se separan los sólidos por la acción de la gravedad. Suele llevarse a cabo en tanques circulares, aunque también pueden ser rectangulares, con una pendiente en el fondo inclinada hacia el centro, donde se concentran y se extraen los fangos (lo más pesado), los cuales van directamente a la línea de fangos o a los tratamientos biológicos. Estos recipientes normalmente presentan un puente en la superficie con unas raquetas en el fondo que empujan los fangos hacia la salida del decantador y otras en la superficie para retirar los flotantes.
   - *Flotación:* es un proceso fisicoquímico de tres fases (sólido-líquido-gaseoso) que tiene por objetivo la separación de partículas suspendidas difícilmente decantables mediante la adhesión selectiva del material a burbujas de aire. Para esto se introducen burbujas de aire que arrastran a las partículas hacia la superficie, donde son fácilmente eliminadas.
3. *Tratamientos secundarios:* incluyen procesos biológicos, con sedimentación secundaria, y físico-químicos. Los procesos biológicos tienen por objeto eliminar la mayor parte de la materia orgánica biodegradable no retenida durante el tratamiento primario. El proceso consiste en promover y mantener colonias de bacterias que estabilicen el contenido orgánico que les llega y, en segundo lugar, separar esas colonias mediante decantación (sedimentación secundaria). En este tipo de tratamientos es donde existe una mayor diversidad de sistemas de depuración, que pueden congregarse en dos grandes grupos: lechos bacterianos o filtros percoladores y lodos o fangos activos.
   - *Lechos bacterianos o filtros percoladores:* el sistema consiste en depósitos rellenos de un medio filtrante de gran superficie, recubierto de una película de organismos depuradores, a través del cual fluye el agua residual. Cuando los organismos crecen aumentan el espesor de la película, entrando los más

profundos en una fase endógena de crecimiento, a partir de la cual pierden su capacidad de adherirse a la superficie del relleno, por lo que se desprende la película y comienza el crecimiento de una nueva. La película así eliminada es arrastrada por la corriente de agua recogiéndose con ella en el fondo del filtro. A continuación pasa a un decantador secundario donde se clarifica.

- *Lodos o fangos activados:* el sistema consiste en desarrollar en cubas, aireadas y/o agitadas por diferentes sistemas, un cultivo bacteriano alimentado con el agua residual. Este cultivo bacteriano forma unos lodos activos que, tras un tiempo de contacto, se envían junto al agua residual a un clarificador (decantador secundario), donde se separa el agua depurada de los fangos. Un porcentaje de estos últimos se suele recircular al depósito de aireación para mantener en el mismo una concentración suficiente de biomasa activa. La fracción orgánica queda concentrada en forma de lodo o fango, que deberá también tratarse adecuadamente para facilitar su aprovechamiento o posibilitar su destrucción o almacenamiento seguro. El tratamiento normal de los lodos incluye fundamentalmente tres operaciones unitarias: espesamiento, digestión anaerobia y deshidratación.

Estas técnicas pueden ser muy útiles para el tratamiento de aguas residuales de diferentes tipos, pero no son adecuadas para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de las plantas de extracción de aceite. Esto es debido a su alto contenido en polifenoles, que les confiere un fuerte carácter bactericida que inhabilita los tratamientos biológicos, lo cual provoca la necesidad de un sobredimensionamiento de las instalaciones. En cuanto a los tratamientos secundarios físico-químicos, el proceso más extendido es la coagulación-floculación, aunque actualmente también se está utilizando la electrofloculación. Se denomina coagulación-floculación a todo proceso de formación de flóculos por unión de las partículas en suspensión existentes en un líquido, mientras que la coagulación es la floculación provocada por adición de productos químicos denominados coagulantes. La adicción de coagulantes puede facilitar la separación por sedimentación o filtración. Al ser coloides de carga negativa los más frecuentes en las aguas residuales, se necesitan, para conseguir una buena decantación, coloides con carga positiva, por lo que la elección de los

coagulantes queda prácticamente limitada a sales de Fe, de Al y a cal, bien aisladamente o combinados entre sí. En ocasiones también puede ser necesario suministrar polielectrolitos, que son polímeros orgánicos con cargas positivas y negativas que mejoran el rendimiento económico de la coagulación.

Este proceso se suele llevar a cabo en un decantador donde al agua entrante previamente se le han añadido los agentes coagulantes. La electrofloculación es un proceso, basado en la coagulación de las partículas, que utiliza como método coagulante el proceso conocido como electrólisis, mediante el uso de electrodos de aluminio y/o hierro.

4. *Tratamientos terciarios:* Tienen por objeto conseguir que las aguas tratadas tengan la mínima carga contaminante y puedan reutilizarse. Se eliminan fundamentalmente sustancias disueltas, en especial nutrientes (nitrógeno y fósforo), iones de metales pesados y compuestos orgánicos no biodegradables (compuestos fenólicos, hidrocarburos clorados, pesticidas, etc.). Engloba una gran variedad de técnicas, entre las que podemos citar la adsorción de compuestos orgánicos por carbón activado, la nitrificación-desnitrificación, una tercera filtración en medio granular (sintético o no), la separación por membranas, el intercambio iónico selectivo y la desinfección.
5. *Tratamiento de fangos:* para completar un sistema de depuración es preciso efectuar un tratamiento adecuado de los fangos producidos. A pesar de que el volumen del fango producido es una mínima parte del agua depurada, el costo del tratamiento y la disposición final de los fangos puede representar de un 25 a un 50 % del costo total de la depuración y este porcentaje aumenta, generalmente con el tamaño de la instalación. El objetivo de un tratamiento de fangos es doble: reducir el volumen que se ha de enviar a un destino final previsto y conveniente y modificar las condiciones del fango para que no resulte perjudicial en ese destino. Los procesos unitarios utilizados en este tratamiento son: espesamiento, acondicionamiento del fango, deshidratación y procesos de conversión (procesos biológicos de digestión anaeróbica y aeróbica, la incineración, la desinfección o pasteurización del fango y finalmente el compostaje).

En la provincia de La Rioja los efluentes de este tipo de industria se tratan en la actualidad en un 100 % en lagunas o estanques de evaporación que tan solo atenúan parcialmente el problema (Tabla 4). Este método tiene como inconvenientes asociados con el proceso de evaporación, la generación de olores y riesgos adicionales para el sistema acuático del área (fenómenos de filtración, contaminación del agua superficial, etc.). Además las desventajas incluyen: la necesidad de grandes áreas para la evaporación en regiones seleccionadas con suelo impermeable (arcilla) distante de áreas pobladas; la necesidad, en muchos casos, de tomar las precauciones oportunas para evitar que los contaminantes alcancen las aguas subterráneas mediante la colocación de revestimientos impermeables en el suelo y las paredes de los estanques y la generación de contaminantes del aire causados por la descomposición de sustancias orgánicas (compuestos volátiles de amonio-hidrocarburos) (Awad, Salman, & Hung, 2006). Actualmente el sector oleícola, no sólo de la provincia de La Rioja sino a nivel mundial, se encuentra ante la necesidad de demandar nuevas tecnologías más sustentables y menos agresivas con el medioambiente en el tratamiento de los efluentes acuosos procedentes de las plantas de extracción de aceite. Algunas líneas de investigación se encaminan hacia la biotecnología para el tratamiento de estas aguas y específicamente al uso de los hongos de la “podredumbre blanca” de la madera para desintoxicar las aguas residuales industriales, reduciendo la toxicidad de los fenoles.

Las investigaciones más relevantes se han centrado en la explotación de sólo unas pocas especies, por ejemplo, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete flavido-alba*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*, y por lo tanto un gran número de otros macrohongos potencialmente útiles permanecen poco estudiados o no se han explorado en absoluto (Koutrotsios & Zervakis, 2014).

Por lo tanto, en el presente trabajo se examinaron otras especies de hongos de pudrición blanca de la madera para incluirlos, ya sea en una etapa de pretratamiento del alpechín, para disminuir el contenido de compuestos fenólicos en el efluente y por ende la toxicidad antes de su procesamiento con otros microorganismos, o como los principales agentes exclusivos para la remediación de alpechín.

1.4 Hongos basidiomicetos y enzimas lacasas

Muchos estudios han demostrado que los hongos basidiomicetos de pudrición blanca pueden degradar una amplia variedad de colorantes estructuralmente diversos, tales como derivados azo, antraquinónicos, heterocíclicos de trifenilmetano y colorantes poliméricos debido a las enzimas del sistema de degradación de lignina: lignina-peroxidasa (LiP), manganeso-peroxidasa (MnP) y lacasa (L) (Cripps, Bumpus, & Aust, 1990; Vicuña, González, Seelenfreund, Rüttimann, & Salas, 1993; Heinfling, Martinez, Martinez, Bergbauer, & Szewzyk, 1998).

Entre las características principales de los hongos está la de realizar una degradación externa de los nutrientes, para lo cual segregan enzimas al medio extracelular y ellas transforman el sustrato en moléculas de fácil asimilación. Los hongos crecen normalmente a temperaturas cercanas a los 25 °C, aunque existen algunas especies termófilas que se desarrollan por encima de los 50 °C. Por otro lado ciertas variedades de hongos pueden desarrollar estructuras de resistencia frente a bajas temperaturas. Su crecimiento óptimo tiene lugar generalmente a pH ácido (4 a 5), en contraposición a las bacterias que suelen tener un desarrollo óptimo a pH levemente alcalino.

En particular, las lacasas (bencenodiol, oxígeno óxidorreductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas extracelulares, multicobreoxidasas que utilizan oxígeno molecular para oxidar diversos compuestos aromáticos y no aromáticos por un mecanismo de reacción catalizado por radicales (Saparrat, Martínez, Cabello, & Arambarri, 2002). Yoshida en 1883 (citado por Alcalde, 2007) realizó su identificación originalmente en los exudados del árbol de la laca japonesa *Rhus vernicifera* y de ahí se derivó su nombre. Las lacasas se han encontrado también en plantas, en insectos y bacterias, pero son predominantes en los hongos. La actividad de la lacasa se ha demostrado en más de 60 cepas de hongos que pertenecen a *Basidiomicetos*, *Deuteromicetos* y *Ascomicetos*, siendo documentada en prácticamente todos los hongos examinados (Gianfreda, Xu, & Bollag, Lacasses: A usefull group of oxidoreductive enzymes, 1999). Su presencia en las plantas parece estar mucho más limitada que en los hongos, aunque se cree que están presentes en todo el reino vegetal. Existe una fuerte evidencia de la amplia distribución de las lacasas en procariotas (Alcalde M. , 2007).

La lacasa cataliza la reducción del oxigeno molecular a agua con la simultánea oxidación del sustrato reducido, vía la transferencia de cuatro electrones, sin producir peróxido de hidrogeno. Es complicado formular una definición precisa de la actividad de la lacasa debido a que, aunque las lacasas actúan preferentemente en compuestos fenólicos, su espectro de sustratos es enorme y el rango de sustratos oxidados varía de una lacasa a otra. Además existe un solapamiento en el rango de sustratos con otro tipo de oxidasa (que contiene cobre), tirosinasa, teóricamente una monooxigenasa monofenólica.

Las lacasas pueden convertir o- y p-difenoles, aminofenoles, fenoles metoxi-sustituidos, bencenotioles, polifenoles, poliaminas, hidroxindoles, algunas aril-diaminas y una considerable gama de otros compuestos, pero no oxidan la tirosina (mientras que las tirosinasas si lo hacen). Compuestos metálicos inorgánicos/orgánicos son también sustratos de la lacasa. Mn^{2+} que se oxida a Mn^{3+} y también $Fe(EDTA)^{2-}$ son aceptados por la enzima. Todas las lacasas conocidas catalizan la oxidación de ácido ascórbico y de fenol con eficiencias igualmente altas. Los difenoles simples como hidroquinona y catecol son generalmente buenos sustratos, pero guayacol y 2,6-dimetoxifenol son a menudo mejores. La p-fenilendiamina es un sustrato utilizado con frecuencia.

Las lacasas pueden ser inhibidas muy fuertemente por diversos compuestos químicos. Aniones pequeños, tales como azida, halogenuros, cianuro, tiocianuro e hidróxido ocasionan una interrupción en la transferencia de electrones internos y la inhibición de la actividad. Otros inhibidores incluyen iones metálicos (por ejemplo, Hg^{2+}), ácidos grasos, reactivos con el grupo funcional sulfhidrilo, hidroxiglicina, ácido kójico, las reacciones con dedesferal y detergentes catiónicos de amonio cuaternario pueden implicar modificaciones de residuos de aminoácidos, cambios conformacionales o quelación del Cu, que contiene la enzima (Gianfreda, Xu, & Bollag, 1999; Call y Mucke, 1997). La eliminación selectiva de Cu por agentes quelantes (EDTA, dimetilglioxima, N,N-dietilditiocarbamato, NTA o ácido nitrilotriacético) conduce a una pérdida de actividad catalítica.

Los análisis filogenéticos basados en alineamientos secuenciales han mostrado que los dominios de enlace de cobre de la lacasa están altamente conservados, incluso cuando el resto de la molécula muestra una amplia variabilidad. La topología de los

árboles filogenéticos obtenidos sugiere que podría existir una sola rama monofilética de las lacasas fúngicas. Se supone que las lacasas son evolutivamente enzimas muy antiguas, y que la actividad de la enzima ligada a tres sitios diferentes de cobre debe haber surgido temprano en el curso de la evolución. En un estudio reciente, los alineamientos secuenciales de más de 100 lacasas vegetales y fúngicas dieron como resultado la identificación de una firma secuencial que caracteriza de forma única las lacasas como un subgrupo distintivo de enzimas de la familia multicobreoxidasas. Esta firma, contiene los residuos de doce aminoácidos que sirven como ligandos de cobre (Kumar, Phale, Durani, & Wangikar, 2003). Esta conservación estructural refleja un mecanismo de reacción común para la oxidación del cobre y la reducción de O_2 en estas enzimas (Alcalde M. , 2007).

Las lacasas contienen cuatro átomos de cobre por monómero y ningún co-factor.

El potencial redox (E°) es decir, la energía requerida para capturar un electrón de un sustrato reducido con la formación correspondiente de un radical catiónico, es una de las características más importantes de las lacasas. El E° de las lacasas fúngicas es mucho mayor que el de las vegetales o las lacasas bacterianas. Las peroxidasas ligninolíticas son capaces de oxidar sustratos de muy alto potencial eléctrico, hasta 1,49 V. Las lacasas, sin embargo, no pueden oxidar sustratos no fenólicos con electropotenciales superiores a 1,06 V. La reactividad de las lacasas se ha correlacionado con su potencial redox, que se cree desempeña un papel importante en el rendimiento global de estas enzimas (Xu, y otros, 1998). No se ha dilucidado completamente el mecanismo de transferencia de electrones ni la reducción del oxígeno a agua. Sin embargo existen hechos bien establecidos:

1) Las lacasas reaccionan oxidando al sustrato reducido por medio del Cu^{2+} (mediante la abstracción de un electrón). En consecuencia, se forma un radical libre (catiónico) que puede someterse a la posterior oxidación catalizada por la lacasa (por ejemplo, fenol a quinona) o reacciones no enzimáticas (por ejemplo, hidratación o polimerización).

2) Como la oxidación del sustrato con un electrón se acopla a la reducción del oxígeno por cuatro electrones, el mecanismo no es sencillo. Podemos imaginar que la lacasa opera como una batería, almacenando electrones de reacciones de oxidación individuales con el fin de reducir al oxígeno molecular. Por lo que, es

necesaria la oxidación de cuatro moléculas de sustrato reducido para la reducción completa de oxígeno molecular a agua.

Se ha sugerido que las lacasas cumplen diferentes funciones fisiológicas tales como la respuesta a las heridas en las plantas, el desarrollo de los cuerpos fructíferos, la reconstitución de la pared celular y el movimiento metabólico de la materia húmica del suelo. Se cree también que las lacasas desempeñan papeles en patogénesis (factores de virulencia fúngica), la esporulación, la pigmentación de esporas fúngicas y la morfogénesis fúngica en general. Una de las más controvertidas y estudiadas funciones biológicas de las lacasas se relaciona con el proceso de lignificación de las células de las paredes de la planta y la despolimerización de la lignina durante la pudrición blanca de la madera. La lignina, que es un componente estructural de la pared celular de la planta, es un biopolímero complejo polifenólico heterogéneo que consiste en unidades fenil-propanol ensambladas por diversos enlaces no hidrolizables C-C y C-O. La considerable abundancia de hongos *Basidiomicetos*, de pudrición de la madera, como productores de lacasa parece indicar que la función principal de lacasa fúngica es despolimerizar la lignina. Sin embargo, esta función contrasta con la de las lacasas en plantas que son componentes esenciales en el proceso de síntesis de la lignina. Las más importantes enzimas que degradan la lignina son lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas pero algunas otras enzimas tales como la celobiosa: quinona oxidorreductasa, deshidrogenasa celobiosa, glioxalato oxidasa, glucosa oxidasas (glucosa 1-piranosa oxidasa y 2-oxidasa), alcohol veratrílico oxidasa y algunas esterasas también pueden desempeñar un papel en el complejo proceso de descomposición de la madera. En consecuencia, el proceso de biodegradación de la lignina implica los efectos sinérgicos de muchas enzimas y componentes no enzimáticos (mediadores) que interactúan para alcanzar un equilibrio entre la polimerización y despolimerización enzimática. De hecho, alguna evidencia experimental sugiere que la actuación de la lacasa en la lignina puede mostrar ambas actividades. Lo que está claro es que las enzimas presuntamente implicadas en la degradación de la lignina producen especies altamente reactivas (y por lo tanto muy tóxicas) de las que el micelio fúngico debe ser protegido. Podría ser que una de las funciones de la lacasa sea compactar estos compuestos mediante la promoción de la polimerización antes de

que puedan entrar a la hifa. Sin embargo, al presente, la información disponible es insuficiente para lograr definir conclusiones sobre el papel de las lacasas en los procesos de lignificación/deslignificación (Alcalde M. , 2007).

Las lacasas se utilizan cada vez más en una amplia variedad de procesos industriales oxidativos tales como la deslignificación, teñido o blanqueo de manchas en textiles, biorremediación, modificación de fibra vegetal, la producción de etanol, biosensores, células de biocombustibles, etc. Para usarla industrialmente generalmente se requiere la sobreproducción de la enzima en un huésped heterólogo, como un requisito indispensable. De hecho, la mayoría de las lacasas comerciales se producen en anfitriones de *Aspergillus* (Alcalde M. , 2007).

En los últimos 10 años la versatilidad de la lacasa se ha ampliado por el descubrimiento del sistema mediador de lacasa (LMS). La combinación de la enzima con moléculas de bajo peso molecular tales como 2,2′-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) o 1-hidroxibenzotriazol (HBT) no sólo conduce a tasas más altas en la conversión de sustratos conocidos sino también añade nuevas reacciones en las que la lacasa no puede actuar individualmente o sólo lo hacía de forma marginal. Generalmente, todos los mediadores de las lacasas son también sustratos para la enzima (por ejemplo siringaldazina). Ellos se oxidan fácilmente, en algunos casos produciendo radicales catiónicos muy inestables y reactivos que pueden a su vez oxidar sustratos más complejos. Los electrones adquiridos por la molécula de lacasa son finalmente transferidos al oxígeno para formar agua.

La acción de un mediador es ventajosa ya que permite que las lacasas logren dos objetivos:

i) la oxidación de polímeros dejando a un lado los problemas de impedimento estérico inherentes (la enzima y el polímero no tienen que interactuar de una manera directa), y

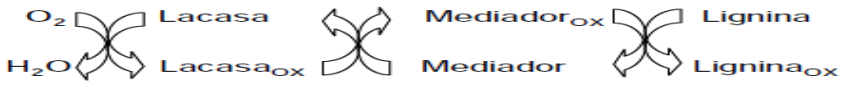
ii) el aumento del rango de sustratos, siendo capaz de oxidar compuestos que tienen potenciales redox superiores a los suyos. Un mediador eficaz no necesariamente debe tener un potencial redox mayor que el de la lacasa, generalmente es más importante poseer un potencial más alto que el del sustrato y libre difusibilidad. También vale la pena señalar que los efectos sinérgicos de mezclas de mediadores pueden

mejorar la oxidación por lacasas (Pickard, Roman, Tinoco, & Vazquez-Duhalt, 1999). Sin embargo, los mediadores químicos son en su mayoría tóxicos, inestables o caros. Actualmente se están considerando nuevos enfoques para superar esta deficiencia, a partir de la búsqueda de mediadores naturales por ejemplo el aminoácido tirosina (Johannes y Majcherczyk, 2000; Camarero, Ibarra, Martínez, & Martínez, 2005) o a la evolución dirigida de las lacasas (Bulter, Alcalde, Volker, Meinhold, & Schlachtbauer, 2003). Esto último se refiere a la emulación en el laboratorio de los procesos claves de la evolución natural (mutación, recombinación y selección) de tal manera que es posible diseñar las enzimas de interés.

La baja especificidad de la enzima Lacasa permite degradar compuestos con una estructura similar a xenobióticos orgánicos como fenoles, aminas sustituidas y plaguicidas) (Mayer & Staples, 2002).

En la Ilustración 5 se muestra una reacción típica de lacasa, donde se oxida la lignina.

Ilustración 5. Esquema de una reacción típica de lacasa



Fuente: Gianfreda, Xu, & Bollag, 1999

Las técnicas tradicionales de blanqueo de la pulpa para la fabricación de papel utilizan agentes a base de cloro, incluyendo Cl_2, que pueden conducir a la liberación de contaminantes tóxicos al ambiente. Bourbonnais y Paice demostraron por primera vez en 1990 que una lacasa de *T. versicolor* de manera eficiente desmetila y deslignifica la pulpa de papel. Desde entonces se han llevado a cabo estudios que analizan los factores involucrados en el proceso (Sigoillot, y otros, 2005; Bajpai, 2004; Call & Mucke, 1997). La aplicación de lacasas en el blanqueo de la pulpa de papel puede dar lugar a mayores rendimientos de pasta y ahorro de energía (Alcalde M. , 2007).

En el caso de los efluentes de la industria del papel, en los que también se encuentran compuestos fenólicos y derivados de la lignina, se han estudiado procesos para su eliminación que incluyen métodos fisicoquímicos con diversas combinaciones de productos químicos y tratamientos biológicos con hongos de pudrición blanca de la madera (Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis, 1997).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son una clase de xenobióticos altamente peligrosos (mutagénicos, carcinogénicos) ampliamente distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos. La lacasa es capaz de oxidar a los HAPs de bajo peso molecular y a los más recalcitrantes (por ejemplo benzo[α]pireno), y convertirlos en compuestos más benignos y menos tóxicos. Para ejercer esta notable biotransformación, la lacasa necesita la presencia de mediadores redox (básicamente HBT y ABTS) (Alcalde, Bulter, & Arnold, 2002; Collins, Kotterman, Field, & Dobson, 1996). Mediadores naturales (tirosina, ácido 4-hidroxibenzoico, alcohol hidroxibencílico) secretados por los hongos de pudrición blanca también han demostrado ser útiles para la oxidación de HAP a quinonas (Johannes & Majcherczyk, 2000). Se ha informado que la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos aumenta con su estado de oxidación. Esto sugiere que la oxidación enzimática seguida por la acción de microorganismos podría ser una estrategia efectiva de remediación de HAP. Adicionalmente, las quinonas resultantes del proceso oxidativo son significativamente menos mutagénicas y carcinogénicas que sus correspondientes HAP (Torres, Bustos-Jaimes, & Le Borgne, 2003).

Debido a la hidrofobicidad y baja solubilidad en agua de muchos sustratos de la lacasa (por ejemplo, lignina, HAP, esteroides), las reacciones se realizan generalmente en presencia de disolventes orgánicos (Torres, Bustos-Jaimes, & Le Borgne, 2003; Gianfreda, Xu, & Bollag, 1999; Yaropolov, Skorobogatko, Vartanov, & Varfolomeyer, 1994). Sin embargo, en estas condiciones las lacasas son bastante inestables siendo desnaturalizadas o inhibidas (Luterek, y otros, 1998). Se han informado de estrategias al respecto para mejorar el rendimiento de las lacasas en disolventes orgánicos, por ejemplo, inmovilización de enzimas (Duran, Rosa, D´Annibale, & Gianfreda, 2002), y evolución molecular dirigida de las lacasas (Alcalde, y otros, 2005).

Los fenoles y sus derivados (clorofenoles, dimetoxifenoles y nitrofenoles) se hallan entre los productos químicos orgánicos más comunes que se encuentran en las aguas residuales industriales y sitios de desechos sanitarios. Ellos pueden ser oxidados por la lacasa dando como resultado la generación de o-benzoquinonas que son menos tóxicas que los fenoles. También son degradados insecticidas organofosforados y agentes nerviosos que contienen enlaces P-S. Una amplia gama de colorantes azoicos se oxidan por lacasas en la presencia de mediadores (Alcalde M. , 2007).

La lacasa es una de las pocas enzimas capaces de catalizar reacciones enzimáticas y electroquímicas, incluso en ausencia de un portador de electrones de bajo peso molecular (Call & Mucke, 1997; Yaropolov, Skorobogatko, Vartanov, & Varfolomeyer, 1994). Un cátodo se puede utilizar para sustituir uno de los sustratos de la reacción enzimática como donante de electrones y son tomados por el Cu de la enzima directamente desde el electrodo. Se han desarrollado un número de biosensores potenciométricos basados en este principio (Freire, Ferreira, Duran, & Kubota, 2003; (Freire R. S., Ferreira, Duran, & Kubota, 2002; Milligan & Ghindilis, 2002).

Las lacasas se están utilizando en la reticulación enzimática de materiales a base de lignina para producir tableros de fibra de densidad media (MDF) que se emplean hoy en día en la construcción de muebles. Anteriormente la fabricación de MDF se basaba en la reticulación no enzimática mediante compuestos nocivos y contaminantes tales como el formaldehido (Felby, Hassingboe, & Lund, 2002).

La hidrólisis ácida diluida de lignocelulosa produce mezclas de azúcar que pueden fermentarse por levadura para producir alcohol combustible. Sin embargo, los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado inhiben la fermentación de la levadura. La expresión heteróloga de la lacasa de *T. versicolor* en *S. cerevisiae* durante la fermentación se ha demostrado recientemente que mejora la producción de etanol combustible a partir de esta materia prima renovable mediante la eliminación de estos compuestos (Larsson, Cassland, & Jönsson, 2001).

La lacasa puede ser utilizada en el procesamiento de la bebida (vino, zumo de frutas y cerveza), la determinación de ácido ascórbico, la gelificación de la pectina de la remolacha azucarera, la panificación, como un biosensor y para mejorar parámetros sensoriales de los alimentos (Minussi, Pastore, & Duran, 2002). La estabilización del

vino es una de las principales aplicaciones de la lacasa en la industria alimentaria. La lacasa se utiliza para oxidar selectivamente a los polifenoles específicos durante el proceso de maderización. El uso de la lacasa en el mosto da como resultado un vino estable con un buen sabor. Ya que todavía no está permitido el uso de lacasa como aditivo alimentario, esta enzima se ha utilizado en la producción de vino en una forma inmovilizada para asegurar su eliminación del mosto y facilitar su reutilización (Servili, De Stefano, Piavquadio, & Sciancalepore, 2000). La tendencia a desarrollar neblinas en algunas cervezas durante el almacenamiento a largo plazo es un problema persistente en la industria cervecera. Como una alternativa al tratamiento tradicional, la lacasa puede añadirse al mosto o al final del proceso. Ya que el oxígeno no es deseable en la cerveza terminada, la adición de lacasa puede eliminar cualquier exceso de oxígeno por lo que se mejora el almacenamiento de la cerveza. Al mismo tiempo la lacasa elimina algunos de los polifenoles que aún puedan quedar en la cerveza. Los complejos de polifenol formados por la lacasa pueden eliminarse por filtración u otros medios de separación (Mathiasen, 1995). Para los zumos de manzana y de uva la excesiva oxidación de compuestos fenólicos casi siempre se ha considerado perjudicial para la calidad organoléptica del producto. Estas bebidas suelen estabilizarse para retrasar la aparición de la formación de turbidez proteína-polifenol. Se han propuesto varios tratamientos enzimáticos para la estabilización del zumo de fruta, entre ellos el uso de lacasa (Minussi, Pastore, & Duran, 2002).

1.5 Planteamiento del problema

Las sustancias contaminantes tales como los fenoles pueden eliminarse en gran parte tratando previamente el alpechín por vía aerobia con microorganismos específicos, después de lo cual la depuración anaerobia tiene lugar sin inhibiciones, siendo la constante de velocidad cinco veces superior a la de antes del pretratamiento (Maestro Durán, Borja Padilla, Martín Martín, Fiestas Ros de Ursinos, & Alba Mendoza, 1991).

Es hipótesis de este trabajo que los hongos de podredumbre blanca de la madera de las variedades *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* y *Phellinus rimosus*, en condiciones óptimas de cultivo, producen distintos tipos de enzimas oxidasas, siendo

las lacasas las más adecuadas en el proceso de decontaminación de efluentes de la industria del procesamiento de aceite de oliva.

Se busca desarrollar una alternativa sustentable en el procesamiento de los efluentes líquidos de la industria olivícola, tratando previamente los mismos con hongos de pudrición blanca. Es por ello, que se propuso como objetivo general de este trabajo de tesis:

- Cultivar variedades de hongos de pudrición blanca de la madera para valorar la capacidad degradativa de sus enzimas en efluentes líquidos de la industria del procesamiento de aceite de oliva.

Para el cumplimiento de este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Cultivar hongos de pudrición blanca: *T. villosa*, *T. versicolor* y *P. rimosus* en diferentes medios.
- Determinar la capacidad de expresión de enzimas por decoloración de colorante.
- Determinar la actividad enzimática y el tiempo de mayor producción de enzima para las especies de hongos de interés en los distintos medios de cultivo.
- Conocer el efecto de algunas variables (tipo y concentración de sustrato, cepa de hongo) involucradas en el proceso de degradación de fenoles.
- Determinar la toxicidad del efluente industrial (alpechín) tratado con los diferentes hongos en estudio sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa L.* (lechuga).
- Correlacionar los parámetros de disminución de color, reducción de polifenoles, actividad enzimática y fitotoxicidad del alpechín tratado.

El proceso fue evaluado mediante la determinación de las actividades de la enzima lacasa (enzima ligninolítica) producida por estos organismos calificados a diferentes concentraciones de alpechín a través de su asociación con la decoloración concomitante del alpechín, la reducción de compuestos fenólicos, y la disminución de la fitotoxicidad (Koutrotsios & Zervakis, 2014).

PARTE EXPERIMENTAL

2. Material y Metodología

2.1 Alpechín

2.1.1 Muestras

Las muestras, tomadas en forma aleatoria a medida que avanzaba el presente trabajo, procedentes de la fábrica de Aceite de Oliva de la Universidad Nacional de La Rioja, se recolectaron en botellas de plástico de 1 litro a la salida de un proceso continuo que contaba con una centrífuga decantadora de tres fases. Se almacenaron a -18 °C hasta su uso.
El contenido de polifenoles totales de la muestra es de 2383 mg/L (método de Folin–Ciocalteu).

2.1.2 Tratamiento previo

Antes de proceder al tratamiento biológico todas las muestras se centrifugaron a 3200 rpm durante 5 minutos con el objeto de eliminar las partículas suspendidas presentes en las mismas. De acuerdo a lo realizado por Koutrotsios & Zervakis, 2014, González, Moreno, Quevedo-Sarmiento, & Ramos-Cormenzana, 1990, y Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos, 1992 el alpechín fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos con el propósito de asegurar que no se introduce otro microorganismo distinto a los aquí ensayados.

2.2 Microorganismos empleados

2.2.1 Cepas de hongos utilizadas y condiciones de cultivos

Se utilizaron con hongos regionales de pudrición blanca de la madera de las siguientes variedades: *T. villosa* cepa CCC31, *T. versicolor* cepa 143M y *P. rimosus* cepa CCC24 provistos y caracterizados por el Dr. Gerardo Robledo – Cátedra de Micología FCEFyN-UNC.

2.2.2 Cultivos de mantenimiento

Las cepas de los hongos antes mencionados fueron repicadas para su mantenimiento en placas de Petri de 90 mm de diámetro sobre 13 mL de medio Agar-extracto de Malta (MA) como sustrato a 25 °C. El medio MA (medio químicamente definido) contenía extracto de malta (20 g/L) y agar (20 g/L). El pH del medio se ajustó a 7,0 con hidróxido de potasio.

Cuando el crecimiento del hongo completó la placa, 7 días para el caso de *T. villosa* y *T. versicolor* y 14 a 20 días para *P. rimosus* (Ilustración 6), se procedió a colocarlos en la heladera (4 °C), para detener su crecimiento y conservarlos a disposición para su uso posterior. Estos cultivos se repicaron cada tres meses.

Ilustración 6. Las tres cepas de hongos trabajadas en este estudio. De izquierda a derecha: *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* y *Phellinus rimosus*

2.3 Valoración de la capacidad de expresión de enzimas por decoloración de colorante

Con la finalidad de verificar en forma rápida que las cepas de hongos trabajadas son productoras de enzimas ligninolíticas o fenol-oxidasas, los hongos se sembraron en un medio sólido conteniendo el colorante RBlue 220 (Munari, A., Calloni, & Dillon, 2007). De esta forma se valoró la capacidad de expresión de enzimas por

decoloración de este colorante que no presenta cambios con la variación de pH a 25 °C.

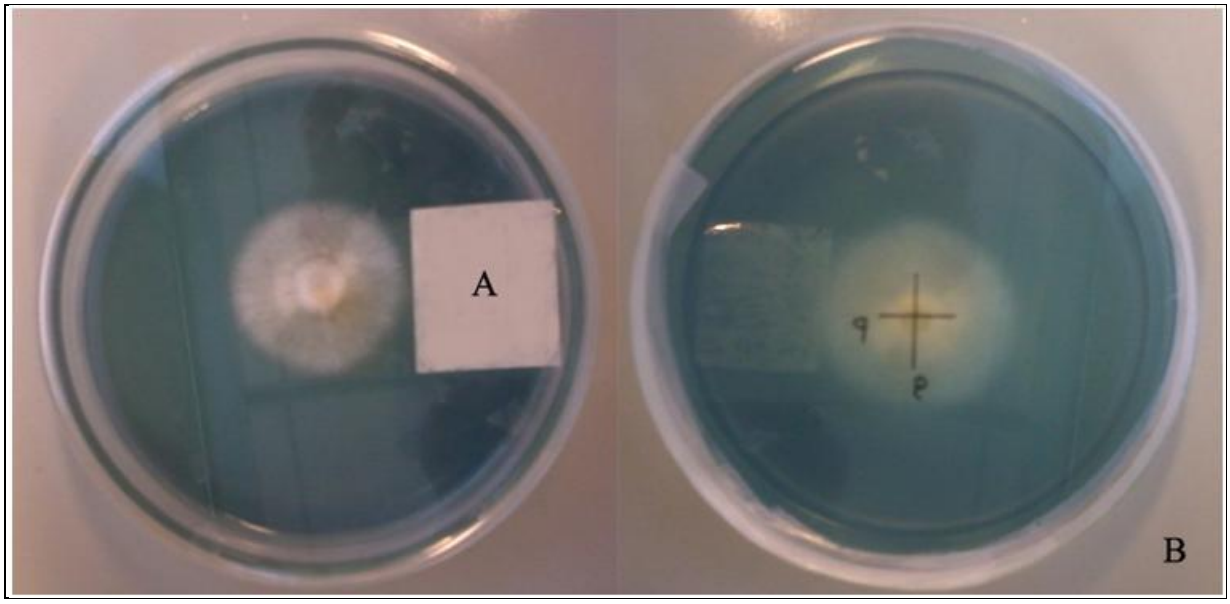
Se colocó, el micelio hacia abajo, sobre el medio y se presionó suavemente con la finalidad de hacer contacto.

Las placas se incubaron en oscuridad a 25 ± 1 °C. Se estimó el crecimiento fúngico y su cinética considerando la extensión miceliar de la colonia, midiendo el diámetro (en mm) del cultivo. Se observaron la coloración de las colonias y sus características de crecimiento (Ilustración 7).

Se procedió a calcular el porcentaje de la relación entre los crecimientos del halo y de la colonia del hongo mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ Relación Halo-Colonia} = \frac{\text{Diámetro del Halo}}{\text{Diámetro de la colonia}} \times 100$$

Ilustración 7. Placa de Petri con el medio con colorante RBlue 220. A: anverso, B: reverso con las dimensiones trazadas para la medición



Los cultivos en placas de Petri mostraron que el colorante Reactive Blue 220 puede actuar como un mediador redox de las reacciones enzimáticas que intervienen en el proceso de decoloración (Munari, A., Calloni, & Dillon, 2007). Las placas fueron monitoreadas regularmente cada 24 h para observar las actividades de crecimiento y decoloración durante 4 a 8 días. Para *T. villosa* y *T. versicolor* se sembraron placas

por triplicado, para *P. rimosus* se sembraron cinco placas. Todas las siembras se realizaron en el mismo momento.

La composición del medio utilizado en este ensayo se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del medio sólido con colorante Reactive Blue 220

Componente	Cantidad
Colorante Reactivo Blue 220	0,01 g
Peptona	0,2 g
Glucosa	1 g
Agar bacteriológico	2 g
Solución de micronutrientes (20 X)	5 mL
Agua destilada	100 mL

Fuente: modificado de Munari, A., Calloni, & Dillon, 2007.

El medio se homogeneizó durante media hora con agitador magnético y luego se autoclavó por 20 minutos a 121 °C.

2.4 Producción de enzimas en distintos medios

El propósito de los ensayos en medio líquido es identificar de distintos medios aquél que genera mejores condiciones de producción de enzima y también determinar cuál es el tiempo de mayor actividad de la enzima, durante el cultivo, lo que equivaldría a mayor producción.

Para la producción de enzimas se ha experimentado con dos diferentes medios líquidos: de Kirk modificado y de Czapek-Dox modificado.

En todos los casos se cortaron con sacabocados inóculos de 10 mm de diámetro (78,54 mm^2 de superficie), de los hongos cultivados en placas de Petri, durante 7 días a 25 °C en medio sólido MA, y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 150 mL de medio líquido. El cultivo se realizó en forma estática.

La producción de enzimas fue seguida mediante muestreos de 3 mL cada 3 ó 4 días durante 21 o 28 días. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorff esterilizados y se conservaron a -4 °C hasta su análisis.

2.4.1 Medio de Kirk modificado

Uno de los medios utilizados fue el medio de Kirk modificado (medio químicamente definido) con la composición que se detalla en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Composición del medio de Kirk modificado

Componente	Cantidad
Glucosa	10 g
Tartrato de amonio*	0,2 g
Fosfato diácido de potasio	2 g
Sulfato de magnesio pentahidratado	0,5 g
Cloruro de calcio	0,1 g
Acetato de sodio	3,3 g
Tween 80 (al 10 %)	5 mL
Agua destilada	1 L
Solución micronutrientes o elementos traza	10 mL

*El tartrato de amonio se preparó con 0,16 g de ácido tartárico y 0,1 mL de solución de NH_3 en agua.

Tabla 7. Composición de la solución de micronutrientes o elementos traza

Componente	Cantidad
Sulfato de cúprico	10 g
Sulfato de manganeso	0,2 g
Sulfato de zinc heptahidratado	0,1 g
Molibdato de sodio dihidratado	0,01 g
Sulfato de magnesio	3 g
Cloruro de sodio	1 g
Ácido bórico	0,01 g
Sulfato ferroso heptahidratado	0,1 g
Cloruro cobaltoso	0,1 g
Sulfato de potasio y aluminio dodecahidrataco	0,01 g
Agua destilada	1 L

El pH del medio de Kirk modificado se ajustó a 5,5 con solución de KOH y luego se autoclavó por 20 minutos a 121 °C. Antes de ajustar el pH se homogeneizó el medio durante media hora con agitador magnético.

2.4.2 Medio de Czapek-Dox modificado

Otro de los medios utilizados fue el medio de Czapek–Dox (medio químicamente definido) y deficiente en carbono (Peláez, Martínez, & Martínez, 1995), con la composición que se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición del medio de Czapek-Dox modificado

Componente	Cantidad
Glucosa	10 g
Tartrato de amonio*[1]	2 g
Fosfato diácido de potasio	1 g
Cloruro de potasio	0,5 g
Extracto de levadura	1 g
Solución de micronutrientes o elementos traza[*2]	1 mL
Agua destilada	1 L

*[1] El tartrato de amonio se preparó con 0,16 g de ácido tartárico y 0,1 mL de solución de amoníaco en agua.
*[2] La solución de micronutrientes usada es la descrita en la Tabla 7.

El pH del medio de Czapek–Dox modificado se ajustó a 6,5 con solución de ácido clorhídrico y luego se autoclavó por 20 minutos a 121 °C. Antes de ajustar el pH se homogeneizó el medio durante media hora con agitador magnético.

2.4.3 Medio sólido con ácido gálico

Se realizó el cultivo de las distintas cepas en un medio conteniendo un fenol estándar-ácido gálico.

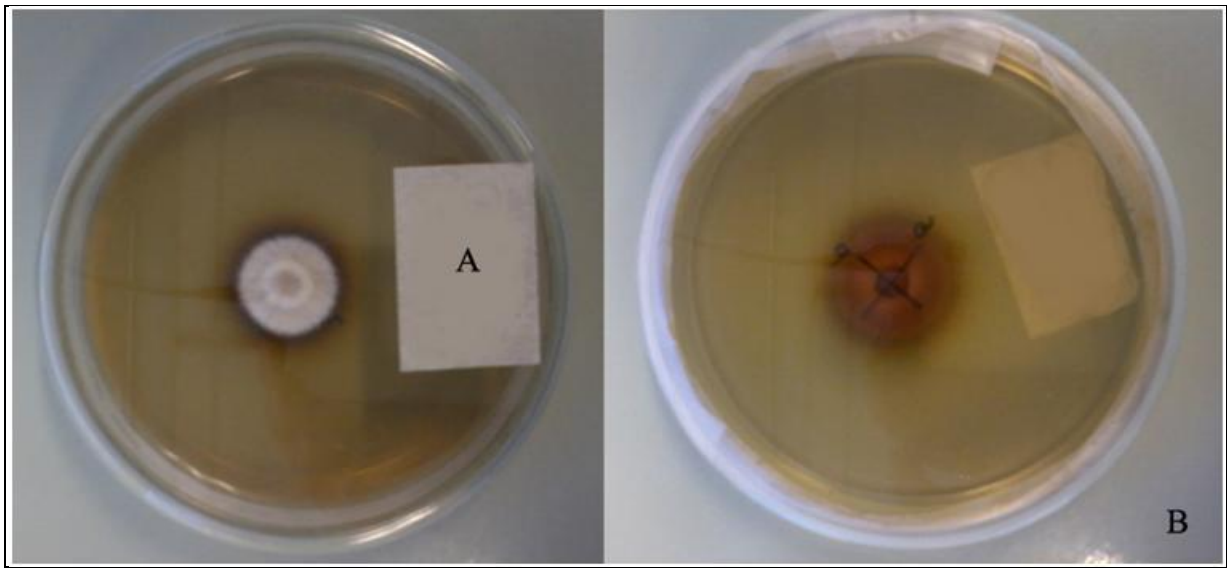
Se cultivaron en placas de Petri con medio sólido (medio SM) de Agar-ácido gálico (Davidson, Campbell, & Blaisdell, 1938) a 25 °C. Se colocó, el micelio hacia abajo, sobre el medio y se presionó suavemente con la finalidad de hacer contacto.

Se estimó el crecimiento fúngico y su cinética considerando la extensión miceliar de la colonia, midiendo el diámetro (en mm) del cultivo. Se observaron la coloración de las colonias y sus características de crecimiento (Ilustración 8).

Se procedió a calcular el porcentaje de la relación entre los crecimientos del halo y de la colonia del hongo mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ Relación Halo-Colonia} = \frac{\text{Diámetro del Halo}}{\text{Diámetro de la colonia}} \times 100$$

Ilustración 8. Placa de Petri con el medio AG. A: anverso, B: reverso con las dimensiones trazadas para la medición



Se realizaron ensayos por heptuplicado con *T. villosa* y por sextuplicado con las otras dos especies estudiadas.

Las placas fueron monitoreadas regularmente cada 24 h para observar las actividades de crecimiento y decoloración durante 4 días.

La composición del medio utilizado en este ensayo se describe en Tabla 9.

Tabla 9. Composición del medio sólido con Agar-ácido gálico (AG)

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	0,3 g
Extracto de malta	0,3 g
Peptona	0,5 g
Glucosa	1 g
Agar bacteriológico	2 g

Ácido gálico	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Fuente: Davidson, Campbell, & Blaisdell, 1938

El pH del medio de AG se ajustó a 5,5 con solución de hidróxido de potasio y luego se autoclavó por 20 minutos a 121 °C. Previo a ajustar el pH se homogeneizó el medio durante media hora con agitador magnético.

2.4.4 Medios con alpechín

Para estudiar el efecto de las distintas variables comprendidas en la decontaminación del alpechín por los hongos en estudio, se realizaron los siguientes ensayos.

2.4.4.1 Medio sólido con alpechín

Se determinó la velocidad de crecimiento del micelio de cada cepa en mm/día, a través de la pendiente de la recta de regresión lineal del diámetro de la colonia versus el tiempo, utilizando el programa Infostat.

Todos los cultivos se evaluaron con respecto a sus velocidades de crecimiento en diferentes diluciones de alpechín. Se utilizó medio MA como control.

Las ensayos se realizaron por triplicado con las distintas cepas de hongos trabajadas, llevándose a cabo en placas de Petri de 90 mm de diámetro utilizando 13 mL de alpechín en diferentes concentraciones que van de 25 a 100 % (25 %, 50 %, 75 % y 100 %) de alpechín esterilizado y solidificado con 1,5 % de agar (Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis, 1997). Se utilizaron placas de Petri con alpechín-agar sin inocular como placas de control y para la estimación cualitativa de la decoloración.

Para cada hongo bajo prueba, se hicieron inoculaciones con porciones de micelio de 10 mm de diámetro y las placas se incubaron en oscuridad a 25 °C. El crecimiento radial se midió diariamente con calibre a lo largo de dos líneas perpendiculares dibujadas en el reverso de las placas y que pasan por el centro del inóculo (Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis, 1997).

Las velocidades de crecimiento del micelio (*a*) se calcularon mediante el ajuste de la función de crecimiento lineal $y = a \cdot x + b$ (donde *a* es el diámetro de crecimiento de la colonia y *x* es el tiempo correspondiente) y se expresaron en mm/día. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (Koutrotsios & Zervakis, 2014).

2.4.4.2 Medio líquido con alpechín

Se prepararon medios líquidos en un volumen de 100 mL utilizando concentraciones de alpechín del 20 % al 100 % pero utilizando medio mínimo de mantenimiento (MMM) para las diluciones de acuerdo a lo realizado por Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos, 1992 (Tabla 10). Se esterilizaron estos medios a 121 °C durante 20 minutos.

Tabla 10. Composición del Medio Mínimo de Mantenimiento (MMM)

Componente	Cantidad
Fosfato bi-potásico	1,60 g
Fosfato mono-potásico	0,50 g
Sulfato amónico	1,25 g
Nitrato amónico	1 g
Sulfato magnésico pentahidratado	0,50 g
Cloruro sódico	0,25 g
Cloruro férrico hexahidratado	0,025 g
Cloruro cálcico	0,010 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos, 1992.

Los medios líquidos se inocularon con discos de micelio de 10 mm de diámetro y se cultivaron a 25°C durante aproximadamente 28 días. No fue necesario ajustar el pH del medio ya que el alpechín tiene un pH entre 4,5-5,5 el cual es favorable para el crecimiento del hongo (Levin, Papinutti, & Forchiassin, 2004).

En estos medios, al cabo del tiempo de incubación, se determinó la actividad enzimática de lacasa, el porcentaje de decoloración del alpechín, la fitotoxicidad y el porcentaje de reducción de polifenoles.

En todos los casos, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 3200 rpm para evitar que los restos de hongos interfieran con las determinaciones.

2.5 Técnicas analíticas utilizadas

2.5.1 Determinación de color

Se utilizaron dos medios para la determinación de la decoloración producida con el tratamiento con los hongos, en medio líquido de alpechín y en medio sólido de alpechín-agar.

a) En medio líquido de alpechín: Las muestras de alpechín tratadas con una de las cepas de los hongos en estudio fueron centrifugadas a 3200 rpm durante 5 minutos para eliminar cualquier resto de hongo que pudiera interferir en la medición. La decoloración en las muestras líquidas se estimó midiendo la Absorbancia a 525 nm usando un espectrofotómetro Nanocolor UV/Vis NV0201 (Koutrotsios & Zervakis, 2014; Martirani, Giardina, Marzullo, & Sannia, 1996).

   En los casos en que fue necesario, las muestras se diluyeron para situar la medida de Absorbancia en el intervalo adecuado.

b) En medio sólido de alpechín-agar: las cepas de los distintos hongos se cultivaron en placas de Petri (de 90 mm de diámetro) con 13 mL de alpechín esterilizado en concentraciones que iban de 25 a 100 % (25, 50, 75 y 100 %), solidificado con 1,5 % de agar. Como control y para la estimación cualitativa de la decoloración se usaron placas de alpechín no inoculadas. Para cada uno de los hongos ensayados se realizaron inoculaciones con discos de 5,5 mm desde un cultivo en crecimiento activo y las placas se incubaron a 25 °C. De estas placas sólidas de alpechín se tomaron muestras de tapones de 10 mm de diámetro con sacabocados estándar, se las disolvió en 5 mL de agua destilada agitando, se las centrifugó 5 min a 3200 rpm para separar restos de hongos y se midió el color a dos longitudes de onda 395 nm y 525 nm, de acuerdo a lo trabajado por Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis, 1997, y por Koutrotsios & Zervakis, 2014, respectivamente, utilizando espectrofotómetro, entre los 5 y 7 días de tratamiento.

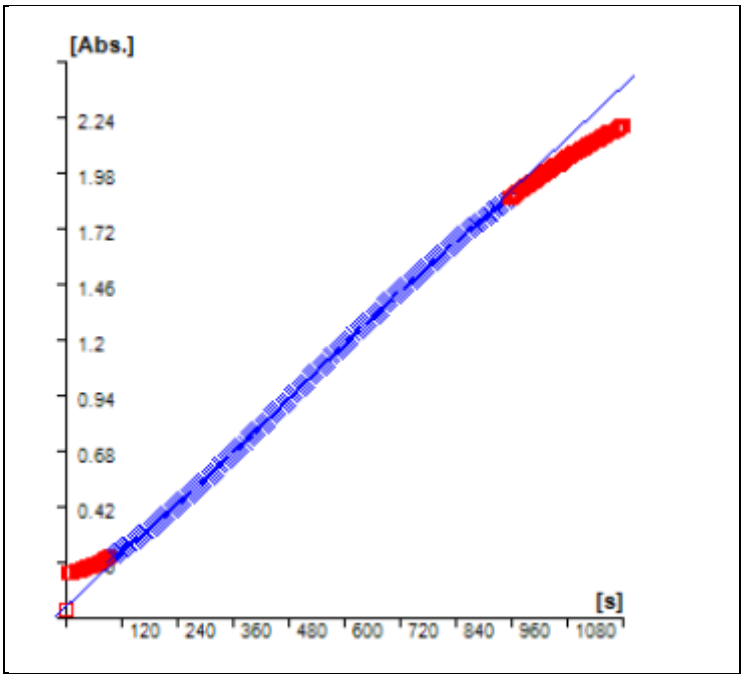
El porcentaje de decoloración relativa se calculó mediante la comparación de la valores de Absorbancia de las placas de alpechín después del tratamiento con los hongos y el valor de la absorbancia del medio sin inóculo.

2.5.2 Valoración de la actividad enzimática de lacasa

La cinética química es el estudio de la velocidad a la cual una reacción ocurre y de los factores que la alteran. En la cinética enzimática, la velocidad habitualmente denominada actividad enzimática involucra el seguimiento de la concentración del sustrato o producto que usa o forma, respectivamente la enzima, durante un intervalo de tiempo, en condiciones isotérmicas, en una solución amortiguadora (Ilustración 9).

En este caso se utilizó, como solución amortiguadora, una disolución de acetato de sodio/ácido acético de pH 4,5 y el sustrato fue una solución de guayacol (o-metoxifenol, 2-hidroxianisol) de concentración 25 mM. Las concentraciones del producto de oxidación coloreado que se forma se registran cada 5 segundos mediante espectrofotometría durante 20 minutos.

Ilustración 9. Una de las curvas temporales obtenidas con *T. versicolor* en medio Czapek-Dox modificado



En celdas de 1,5 mL se colocaron: 200 µL de solución de guayacol 25 mM; 500 µL de buffer HAc/Ac 200 mM (pH 4,5) y 500 µL de extracto enzimático. El extracto enzimático es medio de cultivo líquido retirando el micelio y sus restos por decantación y posterior centrifugación a 3200 rpm durante 5 minutos.

La Absorbancia del producto de oxidación del guayacol se mide a 465 nm (ε= 12100 $M^{-1}.cm^{-1}$) (Mansur, Arias, Copa-Patiño, Flärdh, & González, 2003). La unidad de actividad enzimática (U) se define como 1 µmol de producto oxidado producido por minuto (Saparrat, Martínez, Cabello, & Arambarri, 2002), y se expresa como U/mL de extracto enzimático o como U/L. Ésta última será las unidades utilizadas en este trabajo por comodidad con la expresión de cálculo utilizada.

La actividad de la lacasa (L) se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$\mathbf{UL^{-1}} = \frac{\mathbf{A \times F_t \times V_t \times F_d}}{\varepsilon \times \mathbf{V_m}}$$

A= pendiente de la curva de Absorbancia a 465 nm vs. tiempo

Ft= 60 segundos (lacasas y peroxidasas)

V_t= Volumen total

V_m= Volumen de la muestra

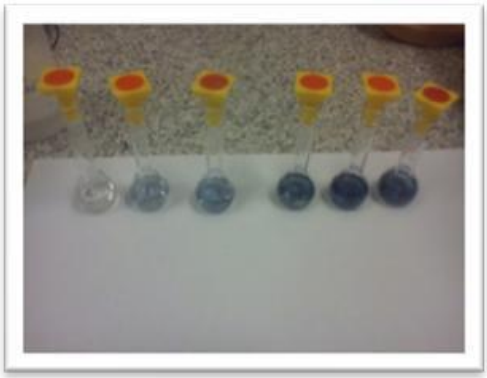
Fd= Factor de dilución = 10^6

2.5.3 Determinación de los polifenoles totales

El contenido total de fenoles se determina a través del método de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción en un medio muy alcalino. El reactivo contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolíbdico fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolíbdico fosfotúngstico a compuestos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

Curva de calibración con ácido gálico: Se prepara una disolución madre de ácido gálico de 1 mg/mL pesando 100 mg de ácido gálico que se colocan en un matraz aforado de 100 mL y se completa con agua destilada. A partir de la solución madre de ácido gálico se preparan las diluciones para obtener concentraciones de 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L, y 1000 mg/L. Esto se realiza tomando 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL y 5 mL, de la solución de ácido gálico en distintos matraces de 5 mL que luego se enrasan con agua destilada. Se toman 0,1 mL de cada una de las soluciones anteriores y se colocan en matraces de 10 mL respectivamente. Luego se adicionan 5 mL de agua destilada, se mezcla, se añade 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, mezclando bien también. Se deja reaccionar durante tres minutos, después de ese tiempo se agrega 1 mL de la solución saturada de Na_2CO_3 y se enrasa con agua destilada conservando el matraz en la oscuridad. También se prepara un blanco con todos los componentes, excepto la disolución de ácido gálico. Se mide la absorbancia del blanco y de las soluciones preparadas, después de 1 hora a 760 nm (Ilustración 10). Con los resultados se procede a la construcción de la curva de calibración.

Ilustración 10. Reacción de Folin-Ciocalteau en las soluciones de ácido gálico para la construcción de la curva de calibración



La determinación de polifenoles en cada una de las muestras líquidas, en las muestras sólidas no se llevaron a cabo mediciones de polifenoles, se realiza tomando 0,1 mL de la misma, se coloca en un matraz de 10 mL, se adicionan 5 mL de agua destilada y se mezcla bien. Posteriormente se añade 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcla nuevamente. Se deja reaccionar durante tres minutos, después de ese tiempo se agrega 1 mL de la solución saturada de Na_2CO_3 y se

enrasa con agua destilada. Se mide la absorbancia después de 1 hora a 760 nm expresando los resultados en mg de ácido gálico/100 mL de alpechín.

2.5.4 Fitotoxicidad

Se recuerda que unos de los objetivos de este trabajo fue determinar la toxicidad del efluente industrial “alpechín”, tratado con los diferentes hongos en estudio sobre la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga). En este sentido, es significativo mencionar la importancia que tiene esta variable de estudio debido a que el incremento de la contaminación en este caso se debe a la dispersión de químicos tóxicos que afectan negativamente el ambiente y la salud de los organismos vivos. Las plantas superiores son reconocidas como excelentes indicadores de contaminación, por tal razón son utilizadas en bioensayos para el monitoreo *in situ* y para la detección de mutágenos ambientales. Durante el desarrollo de las plántulas en los primeros días de germinación y crecimiento ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

La valoración de la toxicidad de las muestras de estudio se realizó a través del bioensayo con semillas de *Lactuca sativa*. La prueba se desarrolla en condiciones estáticas y permite que se puedan evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos del efluente sobre el proceso de germinación de las semillas, y sobre la elongación de la radícula durante los primeros días de crecimiento.

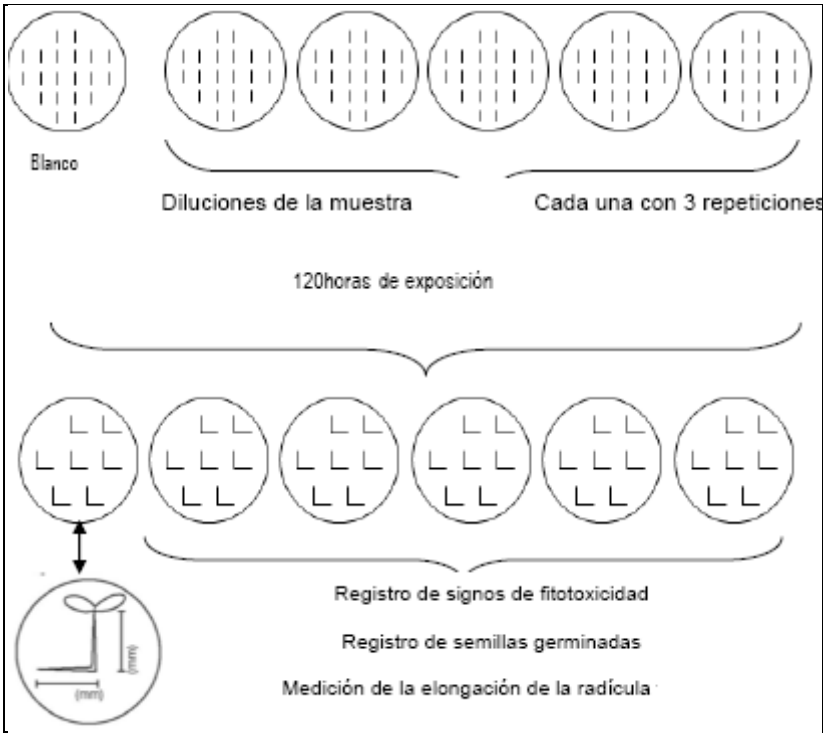
La evaluación del parámetro elongación de la radícula de las semillas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos, que no son suficientes para inhibir la germinación pero que, sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula.

Para este ensayo (Duarte Castro, 2009; Sobrero & Ronco, 2004) se procede de la siguiente manera: en cápsulas de Petri de 90 mm de diámetro, las cuales contienen

un papel de filtro, se añaden 2 mL de cada dilución a ensayar, para luego colocar 20 semillas de *L. sativa* y se incuban durante 120 h con luz, a 24 °C. Al cabo de ese tiempo de exposición, se cuantifica la germinación (porcentaje de semillas germinadas) y el largo o elongación de la radícula.

Como parte de los criterios de calidad que deben cumplir este tipo de bioensayos, se determina el porcentaje de germinación del lote de semillas a ensayar, el cual se mantuvo en el presente caso por encima del 95 %.

Ilustración 11. Ensayo de fitotoxicidad



Fuente: modificado de Sobrero & Ronco (2004)

El material biológico con el que se desarrolló el proyecto fue la semilla *Lactuca sativa* L., por su rápida germinación, facilidad de medición y viabilidad económica, además de las ventajas mencionadas a continuación:

- Alta y constante sensibilidad a tóxicos.
- Estabilidad genética y uniformidad en las poblaciones.
- Representatividad de su nivel trófico.
- Facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio.
- No requiere equipamiento sofisticado.

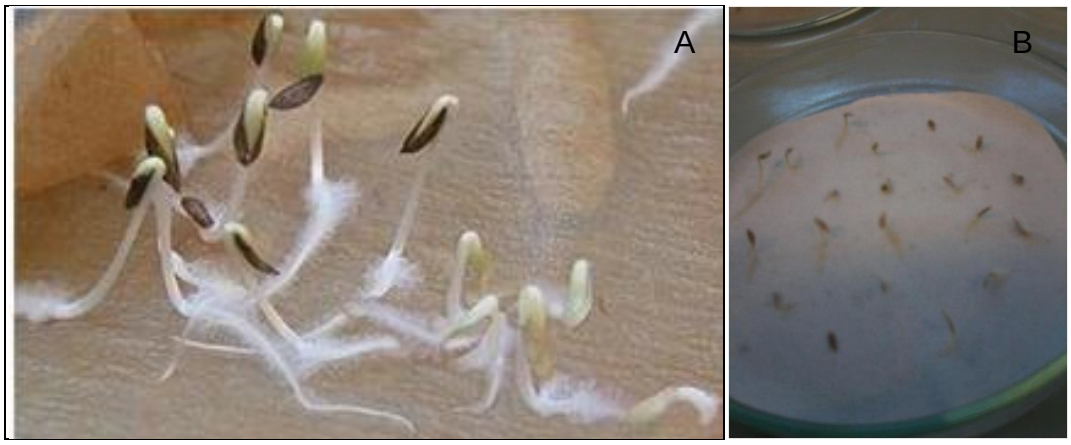
- Utilidad para el control de efluentes (Duarte Castro, 2009).

En cada caja de Petri se ubica papel filtro el cual es la cama de las 20 semillas, colocándolas en una secuencia de 2, 3, 5, 5, 3, 2; como se evidencia en la Ilustración 11. Cabe mencionar que a cada una de las cajas se le agrega 2 mL de la dilución de alpechín previamente tratada con hongos, cada una de las concentraciones tiene tres repeticiones. Obtenido el montaje (Ilustración 12), las cajas son almacenadas durante 5 días lo que equivale a 120 horas en un lugar con condiciones estándar de temperatura y humedad.

Ilustración 12. Montaje de las semillas en las placas de Petri

Al culminar el tiempo de 120 horas se realizan las diferentes mediciones a las estructuras de las semillas, las cuales pueden estar afectadas por la exposición de las sustancias toxicas. Se determinó el crecimiento de la radícula de cada una de las semillas, adicionalmente se estableció el número de semillas germinadas y no germinadas (Ilustraciones Ilustración 13 y Ilustración 14).

Ilustración 13. Semillas de *Lactuca sativa* germinadas



Fuente: Duarte Castro, 2009

Ilustración 14. Proceso de medición

Se evalúa el efecto del alpechín en la germinación, y se calculan los índices de germinación o de Zucconi (IG) (Koutrotsios & Zervakis, 2014) como sigue:

$$IG = (\%\ G \times \%\ L)/100$$

IG: Índice de germinación

G: germinación

L: elongación de la radícula

Se utilizó como un control de semillas de *Lactuca sativa* humedecidas solamente con agua.

2.6 Análisis estadísticos

Los datos presentados son el promedio de los resultados de tres réplicas.
La base informática utilizada fue el software estadístico (InfoStat, 2008). Las diferencias se estimaron mediante análisis de la varianza (ANAVA). En aquellos casos en dónde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), se utilizó un test a posteriori de comparaciones múltiples (Fisher LSD).
El análisis de correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros medidos también se llevo a cabo con el mismo software estadístico.

3. Resultados

3.1 Valoración de la capacidad de expresión de enzimas

El primer objetivo de este trabajo consistió en cultivar las cepas XXXXX como potenciales candidatas a ser utilizadas en la degradación de alpechín. Estos hongos deberían tener la capacidad de expresar enzimas que decoloren el efluente (o degraden fenoles, o lo que fuera). Con el fin de evaluar la capacidad de los hongos en estudio para expresar enzimas que degraden el alpechín se realizaron ensayos con ácido gálico y después con un colorante Reactivo Blue 220, sobre el cual no tienen efecto los cambios de pH.

3.1.1 Medio con ácido gálico

Además de evaluar la capacidad de los hongos en estudio para expresar enzimas que degraden el alpechín, con este medio en particular se valoró el potencial de cada cepa para oxidar un fenol como el ácido gálico presente en el medio agarizado a través de la visualización de los halos de decoloración con el tiempo.
Las tres variedades de hongos de pudrición blanca de la madera estudiadas, *T. villosa* cepa CCC31, *T. versicolor* cepa 143M y *P. rimosus* cepa CCC24, muestran una producción de enzimas ligninolíticas en medio de AG como se indica en la Tabla 11. En la Ilustración 15 se puede seguir la secuencia de crecimiento y desarrollo del halo con el tiempo.

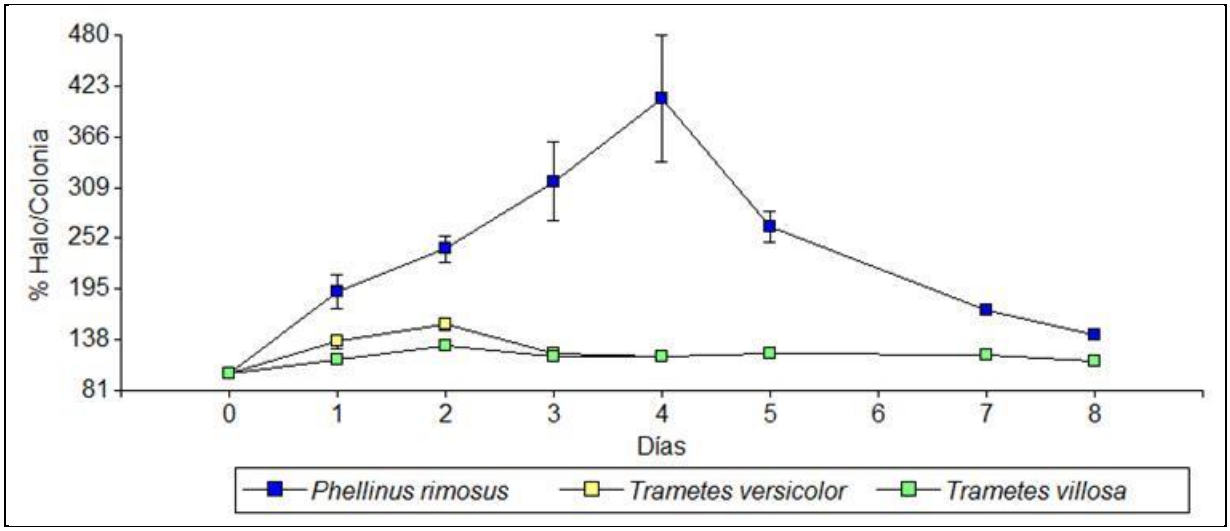
T. villosa se midió en los primeros cuatro casos hasta el día 4 y en las muestras 5, 6 y 7 se siguió hasta que ocupó toda la placa y se hizo imposible continuar con la medición. *T. versicolor* se siguió en todos los casos durante 4 días. *P. rimosus* se siguió en los primeros cuatro casos durante 4 días y en los demás durante 22 días.

Tabla 11. Porcentaje de relación halo/colonia de las 3 cepas de hongos ensayadas en medio AG. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Día	*Trametes villosa*	*Trametes versicolor*	*Phellinus Rimosus*
0	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
1	116 ± 14,06	139 ± 12,15	191 ± 45,41
2	132 ± 6,24	154 ± 15,82	240 ± 36,54
3	119 ± 5,15	122 ± 9,51	315 ± 108,54
4	118 ± 8,16	118 ± 6,29	409 ± 175,09
5	123 ± 8,36	s.d.	264 ± 30,09
6	s.d.	s.d.	s.d.
7	120 ± 0,69	s.d.	170 ± 9,31
8	114 ± 0,00	s.d.	143 ± 2,20

n: número de mediciones; D.E.: desviación estándar; s.d.: sin datos

Ilustración 15. Porcentaje de relación halo/colonia en medio AG



Para *T. villosa* y *T. versicolor* se observó el mayor porcentaje de relación halo/colonia el día 2. En *P. Rimosus*, en cambio, durante los primeros cuatro días no se observó crecimiento de la colonia pero sí un tenue desarrollo del halo que al quinto día se distinguía claramente. El mayor porcentaje de relación halo/colonia se registró, para esta especie, al cuarto día.

En las Ilustraciones Ilustración 16, Ilustración 17 y Ilustración 18 se puede observar, mediante fotografías, el crecimiento en este medio de los hongos en estudio.

Ilustración 16. *Trametes villosa* en medio AG

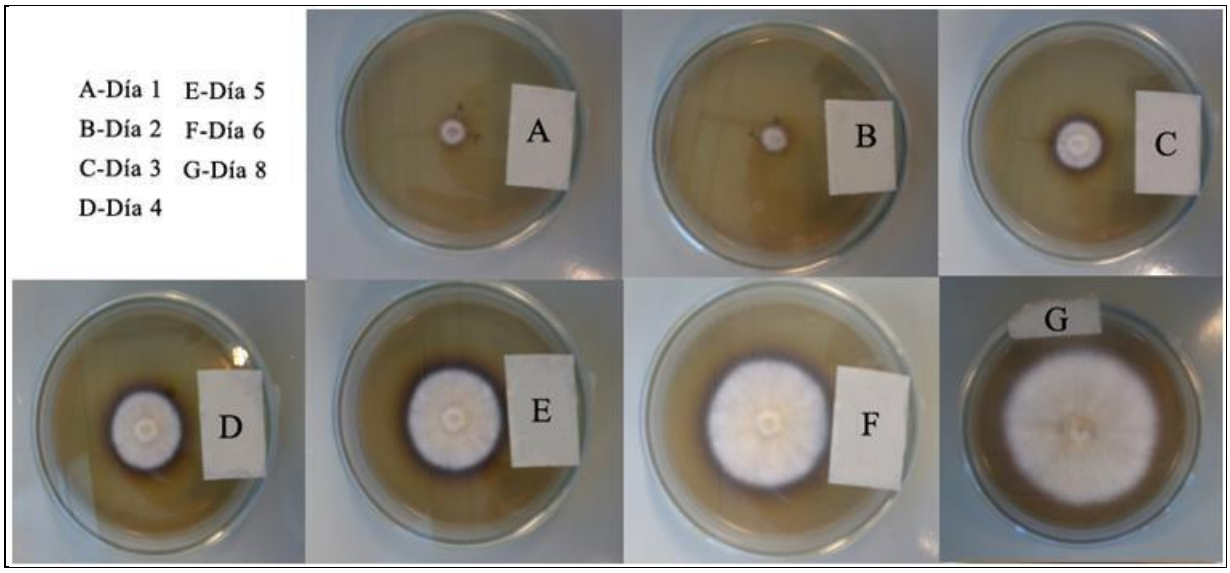


Ilustración 17. *Trametes versicolor* en medio AG. A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 4

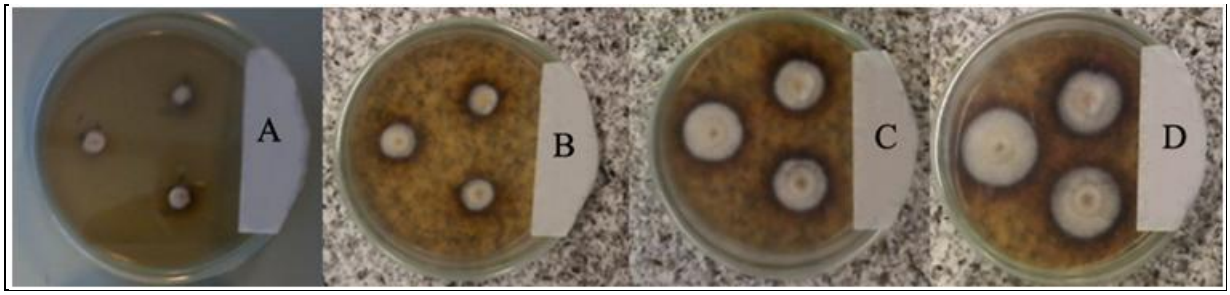
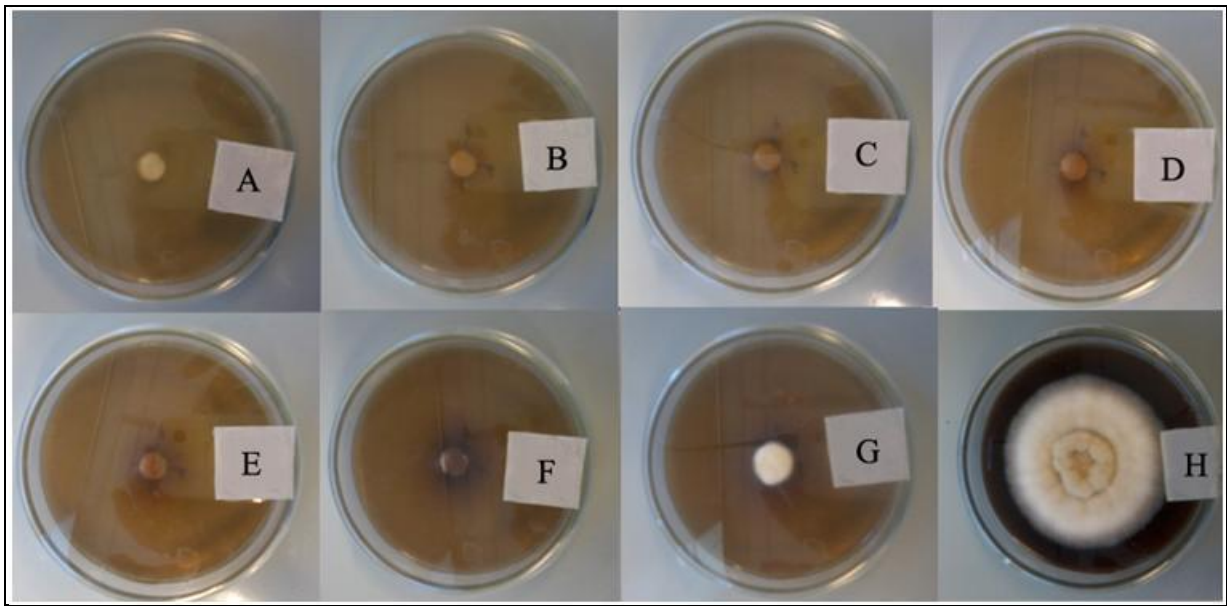


Ilustración 18. *Phellinus rimosus* en medio AG. A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 4, E: Día 5, F: Día 6, G: Día 8, H: Día 23



3.1.2 Medio con colorante Reactive Blue 220

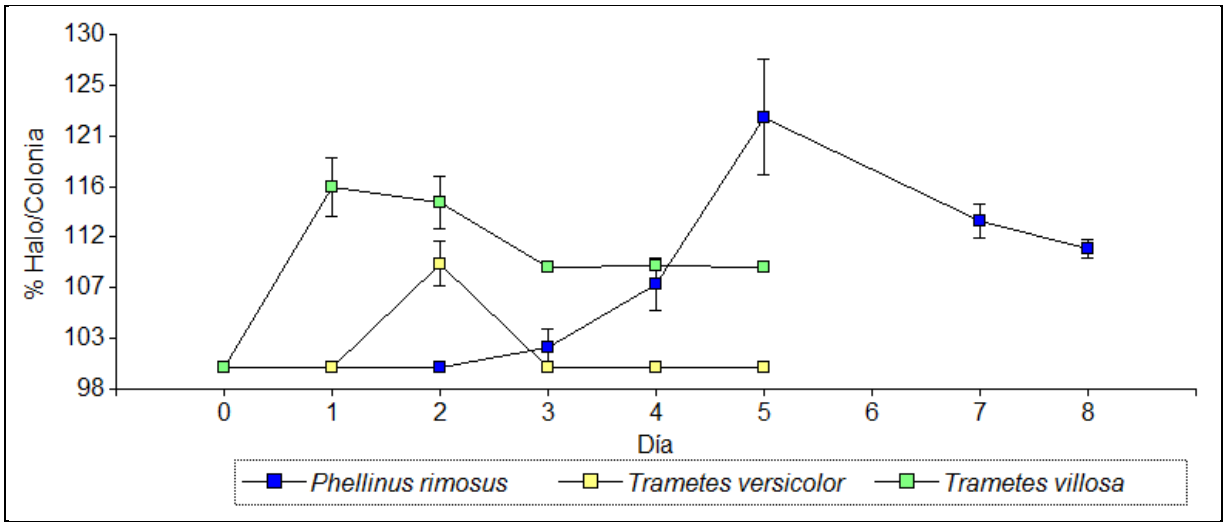
Se evaluó el potencial de cada cepa para decolorar el Reactive Blue 220 presente en el medio agarizado a través de la medición de halos de decoloración y del diámetro de crecimiento de la colonia en función del tiempo. La Tabla 12 y la Ilustración 19 muestran los resultados.

Tabla 12. Porcentaje de relación halo/colonia de las 3 cepas de hongos ensayadas en medio con colorante Reactive Blue 220. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Día	*Trametes villosa*	*Trametes versicolor*	*Phellinus rimosus*
0	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
1	116 ± 4,65	100 ± 12,15	100 ± 0,00
2	115 ± 4,02	109 ± 15,82	100 ± 0,00
3	109 ± 3,70	100 ± 9,51	102 ± 3,83
4	109 ± 1,96	100 ± 6,29	108 ± 5,25
5	109 ± 2,88	100 ± 0,00	122 ± 9,03
6	s.d.	s.d.	s.d.
7	s.d.	s.d.	113 ± 2,58
8	s.d.	s.d.	111 ± 1,42

n: número de mediciones; D.E.: desviación estándar; s.d.: sin datos

Ilustración 19. Porcentaje de relación halo/colonia en medio con colorante Reactive Blue 220



Las tres variedades de hongos estudiadas producen decoloración del medio en diferentes grados y tiempos. El máximo porcentaje de relación halo/colonia de *T. villosa* se produce en el primer día de crecimiento. En *T. versicolor* prácticamente no se observa decoloración del colorante si no hay crecimiento del hongo, obteniéndose la máxima relación al segundo día, llegando a cubrir toda la placa el quinto día. Por último *P. rimosus* produjo su máximo porcentaje en la relación halo/colonia el quinto día y cubrió toda la placa el décimo día, siendo también en este caso mayor que los valores máximos alcanzados por las cepas de *T. villosa* y *versicolor*.

En las Ilustraciones Ilustración 20, Ilustración 21 yIlustración 22 se muestra mediante registro fotográfico como fueron creciendo las distintas cepas de hongos en el medio con el colorante Reactive Blue 220.

Ilustración 20. *Trametes villosa* en medio con el colorante Reactive Blue 220

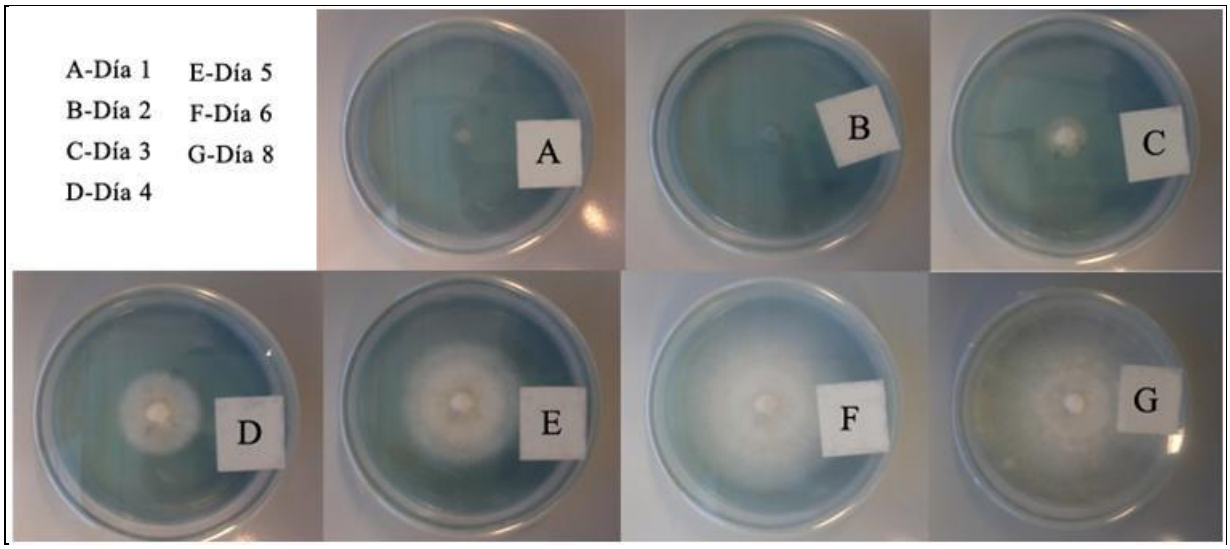


Ilustración 21. *Trametes versicolor* en medio con el colorante Reactive Blue 220

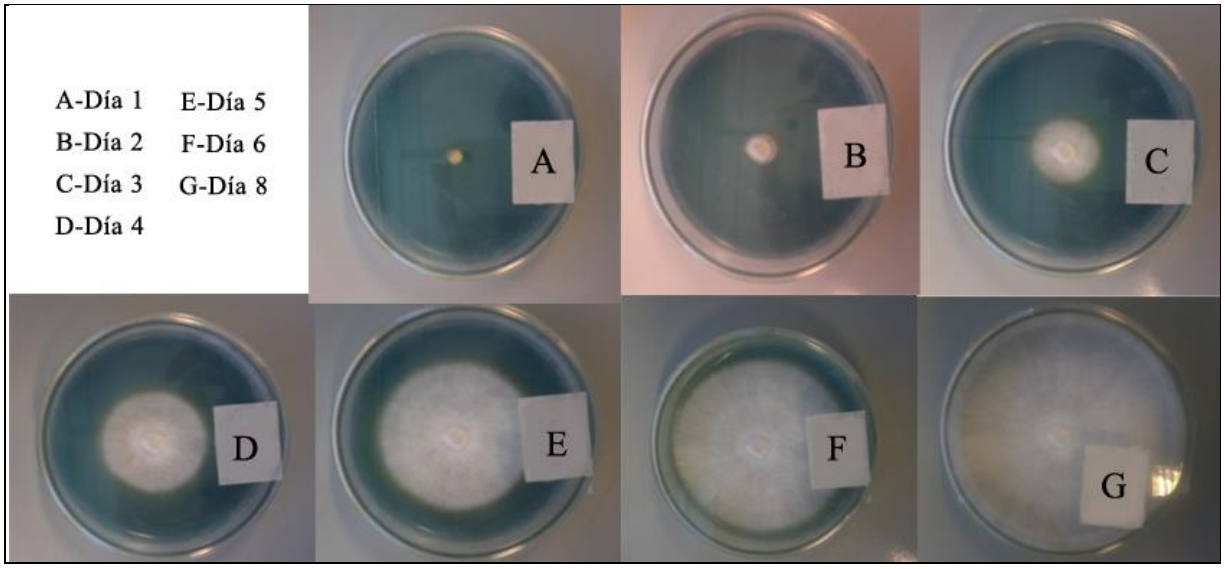
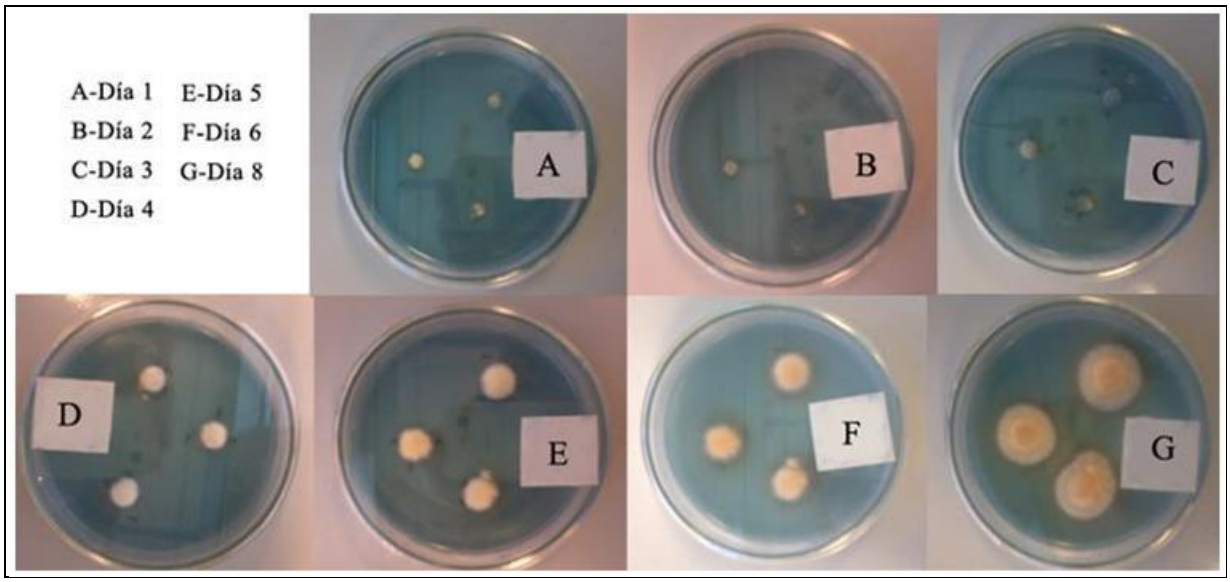


Ilustración 22. *Phellinus Rimosus* en el medio con colorante Reactive Blue 220. A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 4, E: Día 5, F: Día 6, G: Día 8



3.2 Producción de lacasas en medios líquidos: medios de Kirk modificado y Czapek-Dox modificado

El propósito de los ensayos en medio líquido es identificar de distintos medios aquél que genera mejores condiciones de producción de enzima y también determinar cuál es el tiempo de mayor actividad de la enzima, durante el cultivo, lo que equivaldría a mayor producción.

Para la producción de enzimas se ha experimentado con dos diferentes medios líquidos: de Kirk modificado y de Czapek-Dox modificado (Ilustraciones Ilustración 23 y Ilustración 24).

Ilustración 23. Hongos cultivados en medio líquido Kirk modificado

Ilustración 24. Hongos cultivados en medio líquido Czapek-Dox modificado

Para *T. villosa* y *T. versicolor* se consiguió producción de enzimas en el medio Czapek-Dox modificado y la máxima actividad se obtuvo al término del tiempo de incubación, 29 días, para el primero y a los 24 días para el segundo, siendo de 68,3 U/L y de 57,22 U/L respectivamente (Ilustraciones Ilustración 25 y Ilustración 26). Para *P. rimosus* se obtuvo un pico de actividad a los 25 días en el medio de Kirk modificado de 3,46 U/L (Ilustración 27). En el trabajo de Saparrat, Martínez, Cabello, & Arambarri, 2002, para *T. villosa* en medio de Czapek-Dox modificado pero con agitación se obtuvo una mayor actividad de lacasa a los 21 días, con un valor, del mismo orden de magnitud con el resultado obtenido en este trabajo, de 40 U/L.

Con respecto a *T. versicolor* se observó que la actividad máxima en este medio sin agitación es la cuarta parte en promedio de lo informado en el trabajo de Peláez, Martínez, & Martínez, 1995.

En la Tabla 13 se muestra la variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L con el tiempo de las 3 cepas de hongos ensayadas en los medios de Kirk modificado y Czapek-Dox modificado.

Tabla 13. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de las 3 cepas de hongos ensayadas en los medios de Kirk modificado y Czapek-Dox modificado. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Día	*Trametes villosa*		*Trametes versicolor*		*Phellinus Rimosus*	
	Medio de Kirk modificado	Medio de Czapek-Dox modificado	Medio de Kirk modificado	Medio de Czapek-Dox modificado	Medio de Kirk modificado	Medio de Czapek-Dox modificado
3	s.d.	s.d.	s.d.	0,73 ± 1,10	s.d.	s.d.
4	1,83 ± 1,33	s.d.	1,30 ± 0,62	s.d.	0,70 ± 0,40	s.d.
7	0,00 ± 0,00	11,63 ± 3,07	0,97 ± 0,74	3,43 ± 1,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
11	0,20 ± 0,20	10,80 ± 2,25	0,40 ± 0,40	10,30 ± 2,07	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02
14	0,00 ± 0,00	14,72 ± 9,00	s.d.	20,60 ± 5,11	s.d.	0,53 ± 0,40
15	0,00 ± 0,00	s.d.	0,60 ± 0,60	s.d.	0,00 ± 0,00	s.d.
17	s.d.	20,00 ± 4,39	s.d.	31,90 ± 3,57	s.d.	0,02 ± 0,02
18	0,67 ± 0,50	s.d.	0,00 ± 0,00	s.d.	0,10 ± 0,02	s.d.
21	0,00 ± 0,00	34,27 ± 3,95	0,37 ± 0,37	45,67 ± 5,03	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,23
24	s.d.	38,87 ± 9,44	s.d.	54,50 ± 7,50	s.d.	0,00 ± 0,00
25	0,00 ± 0,00	s.d.	0,00 ± 0,00	s.d.	2,60 ± 1,39	s.d.
28	s.d.	s.d.	0,00 ± 0,00	s.d.	0,07 ± 0,06	s.d.
29	s.d.	63,50 ± 4,82	s.d.	42,87 ± 5,54	s.d.	0,20 ± 0,20
32	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	0,14 ± 0,13	s.d.
33	s.d.	s.d.	0,00 ± 0,00	s.d.	s.d.	s.d.

n: número de mediciones; D.E.: desviación estándar; s.d.: sin datos

Ilustración 25. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de *Trametes villosa* vs. tiempo de producción

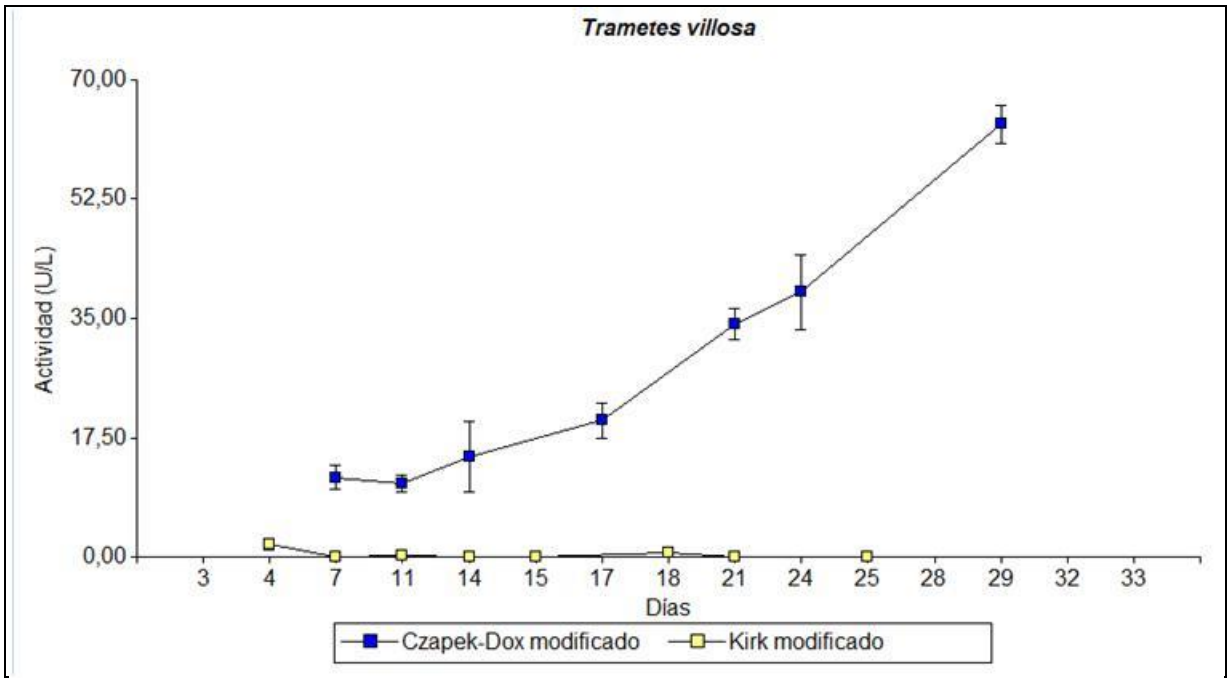


Ilustración 26. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de *Trametes versicolor* vs. tiempo de producción

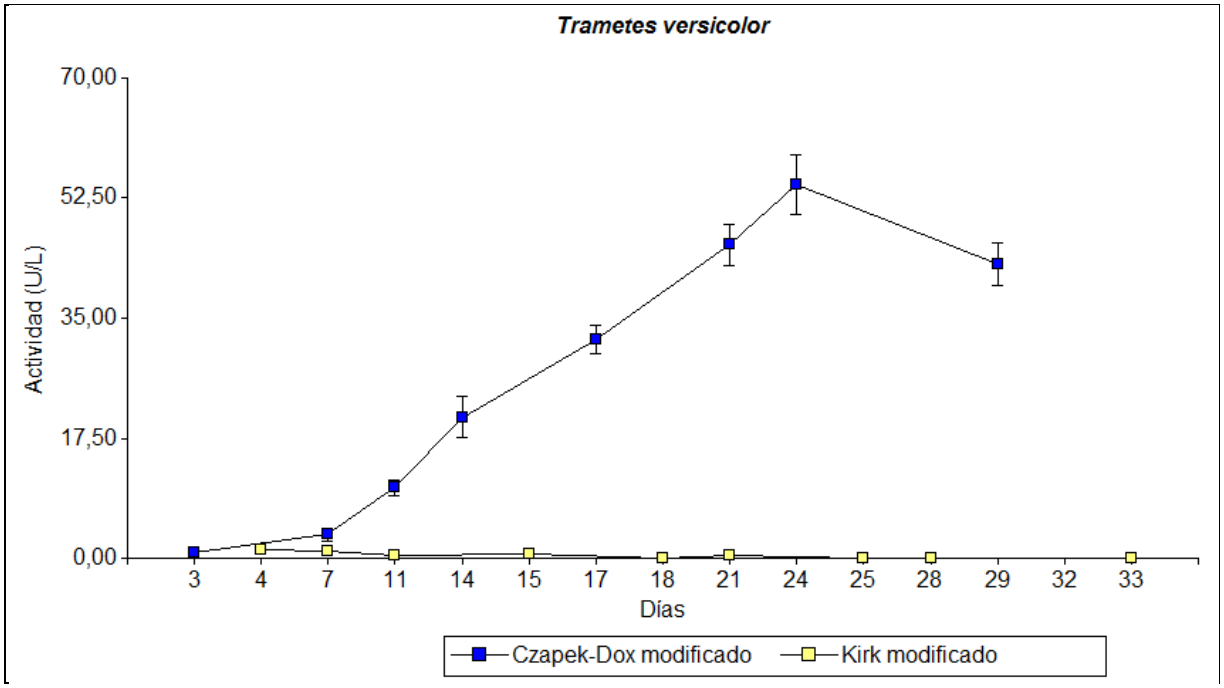
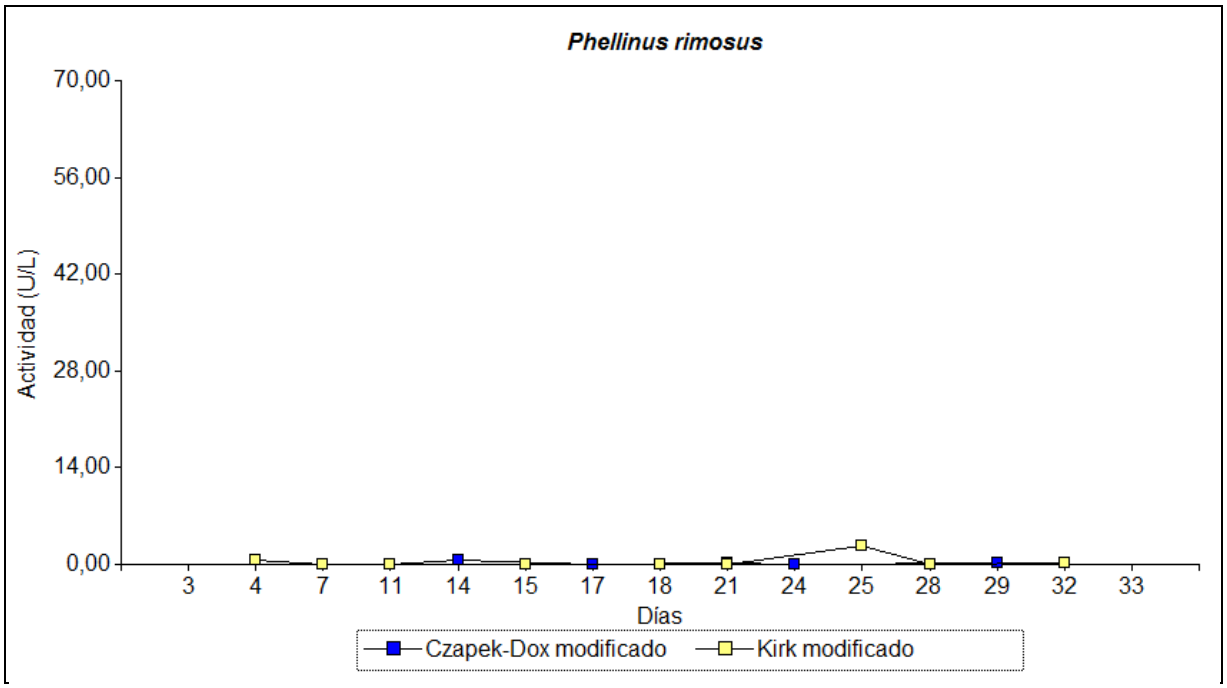


Ilustración 27. Variación de la actividad de la enzima lacasa en U/L de *Phellinus rimosus* con el tiempo de producción



3.3 Producción de lacasas en medio con Agar-ácido gálico

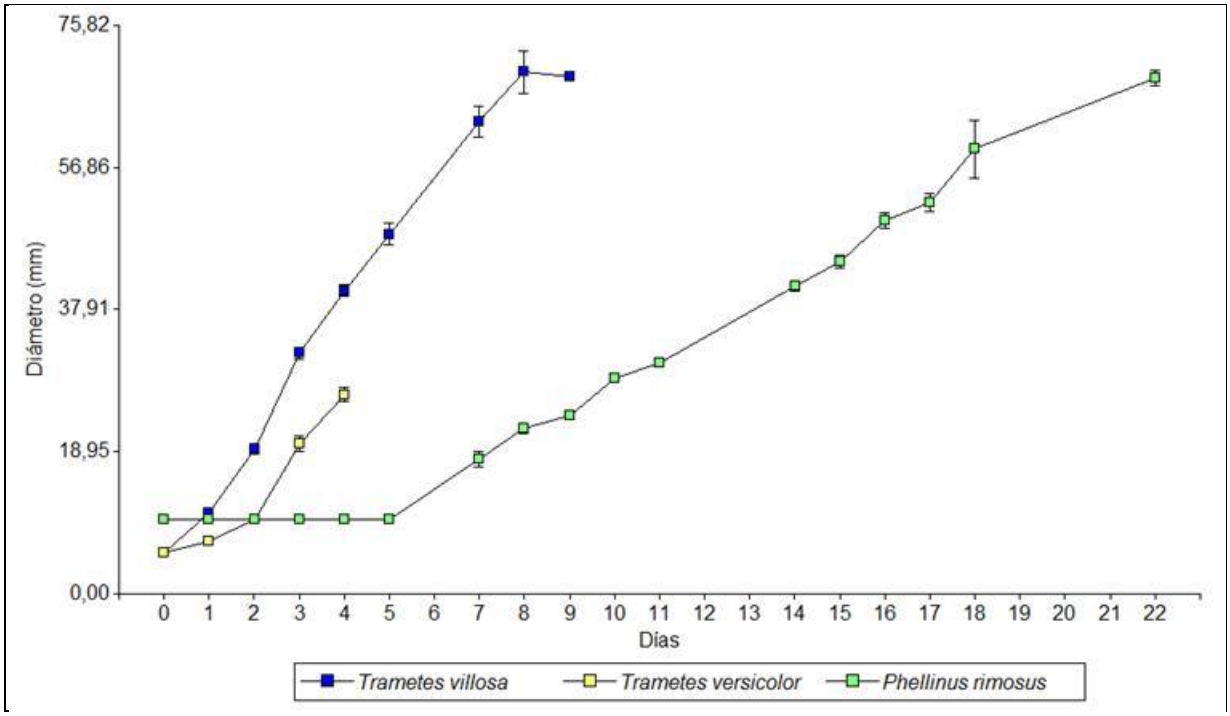
Se cultivaron las cepas de los tres hongos ensayados en placas de Petri con SM de Agar-ácido gálico (AG), cuya composición se detalló en la Tabla 9. Se obtuvieron los resultados que se observan en la Tabla 14 e Ilustración 28.

Tabla 14. Crecimiento del diámetro en función de los días en medio AG-agar de las 3 cepas de hongos ensayadas. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Día	*Trametes villosa*	*Trametes versicolor*	*Phellinus rimosus*
0	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	10,00 ± 0,00
1	10,82 ± 1,05	6,96 ± 1,16	10,00 ± 0,00
2	19,26 ± 1,51	9,97 ± 0,59	10,00 ± 0,00
3	32,11 ± 1,91	20,07 ± 2,43	10,00 ± 0,00
4	40,44 ± 2,00	26,57 ± 2,35	10,00 ± 0,00
5	48,00 ± 2,65	s.d.	10,00 ± 0,00
6	s.d.	s.d.	s.d.
7	63,00 ± 3,61	s.d.	18,00 ± 1,73
8	69,63 ± 4,91	s.d.	22,13 ± 1,21
9	69,00 ± 0,00	s.d.	23,87 ± 0,96
10	s.d.	s.d.	28,80 ± 0,44
11	s.d.	s.d.	30,80 ± 0,53
12	s.d.	s.d.	s.d.
13	s.d.	s.d.	s.d.
14	s.d.	s.d.	41,00 ± 1,00
15	s.d.	s.d.	44,33 ± 1,53
16	s.d.	s.d.	49,80 ± 1,91
17	s.d.	s.d.	52,17 ± 2,02
18	s.d.	s.d.	59,33 ± 6,64
19	s.d.	s.d.	s.d.
20	s.d.	s.d.	s.d.
21	s.d.	s.d.	s.d.
22	s.d.	s.d.	68,77 ± 1,86

n: número de mediciones; D.E.: desviación estándar; s.d.: sin datos

Ilustración 28. Crecimiento del diámetro en función de los días en medio AG-agar



En la Ilustración 28 se observa que *P. rimosus* tiene un periodo de latencia de 5 días en medio AG-agar. A la concentración del 25 % el periodo de latencia fue de 4 días y a los 16 días ocupó toda la placa (Ilustración 29).

3.4 Producción de lacasas en medios con alpechín

3.4.1 Medio sólido con alpechín

Las tres cepas ensayadas fueron capaces de crecer en alpechín solidificado con agar y producir decoloración. Se observó crecimiento de la cepa de *P. rimosus* solo para la concentración del 25 % de alpechín, las de *T. versicolor* y *T. villosa* lo hicieron para concentraciones de alpechín del 25, 50 y 75 %. En la Ilustraciones Ilustración 32 y Ilustración 33 se observa el efecto inhibitorio de la concentración de alpechín en el crecimiento del micelio en las cepas de hongos de *T. villosa* y *T. versicolor*. *P. rimosus* creció sólo cuando la concentración de alpechín era del 25 %.
En cuanto a la decoloración, en las tres cepas ensayadas, se desarrolló más lentamente que el crecimiento radial del micelio, es decir, se observó el desarrollo del hongo y en el interior la decoloración.
En la Tabla 15 se muestra el crecimiento del diámetro del micelio en función de los días en medios con concentraciones de alpechín del 25, 50 y 75 % de las 3 cepas de hongos ensayadas.

Tabla 15. Crecimiento del diámetro del micelio en función de los días en medios con concentraciones de alpechín del 25, 50 y 75 % de las 3 cepas de hongos ensayadas. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Día	*Trametes villosa*			*Trametes versicolor*			*Phellinus rimosus*
	25%	**50%**	**75%**	**25%**	**50%**	**75%**	**25%**
0	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00
1	18,33 ± 1,53	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	9,17 ± 3,18	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00
2	19,33 ± 1,15	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	21,00 ± 3,00	5,50 ± 0,00	5,50 ± 0,00	5,83 ± 0,29
3	30,67 ± 3,51	6,67 ± 2,02	5,50 ± 0,00	31,33 ± 3,21	15,33 ± 1,15	5,50± 0,00	6,33 ± 0,58
4	49,00 ± 2,00	17,33 ± 0,58	11,00 ± 0,00	46,33 ± 2,31	22,73 ± 1,75	5,60 ± 2,08	6,33 ± 0,58
5	65,25 ± 2,47	27,00 ± 0,87	19,00 ± 1,73	58,50 ± 2,12	31,90 ± 1,85	12,80 ± 7,34	9,00 ± 1,00
6	72,65 ± 2,33	34,57 ± 0,98	27,33 ± 5,51	62,50 ± 0,71	37,77 ± 3,28	19,67 ± 5,13	9,00 ± 1,00
7	s.d.	66,00 ± 1,41	36,33 ± 6,66	s.d.	55,50 ± 7,78	28,67 ± 6,81	15,40 ± 6,51
8	s.d.	90,00 ± 0,00	48,00 ± 11,31	s.d.	66,50 ± 7,78	34,50 ± 4,95	25,50 ± 2.12
9	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	71,00 ± 0,00	s.d.	27,85 ± 1,63
10	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	35,50 ± 0,71
11	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	36,50 ± 0,71
12	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	40,00 ± 1,41
13	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	44,00 ± 0,00
14	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	51,00 ± 4,24
15	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	54,50 ± 6,36
16	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	s.d.	63,00 ± 1,41

n: número de mediciones; D.E.: desviación estándar; s.d.: sin datos

Ilustración 29. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo a una concentración de alpechín del 25 %

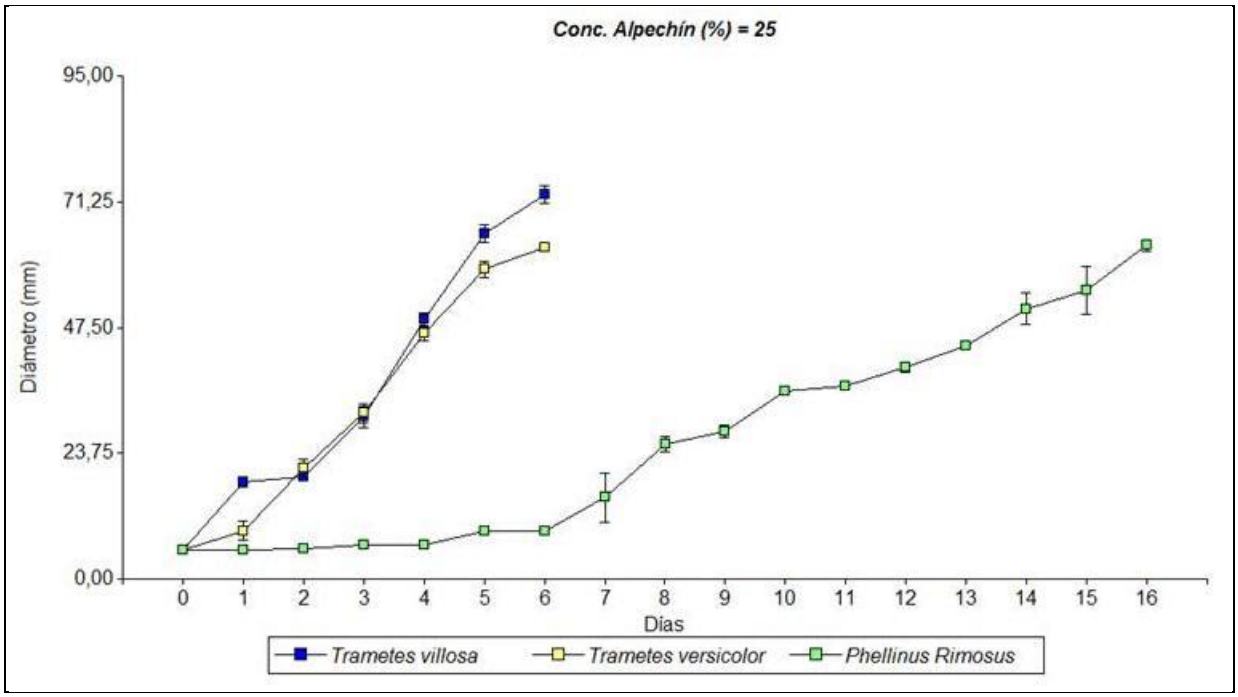


Ilustración 30. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo a una concentración de alpechín del 50 %

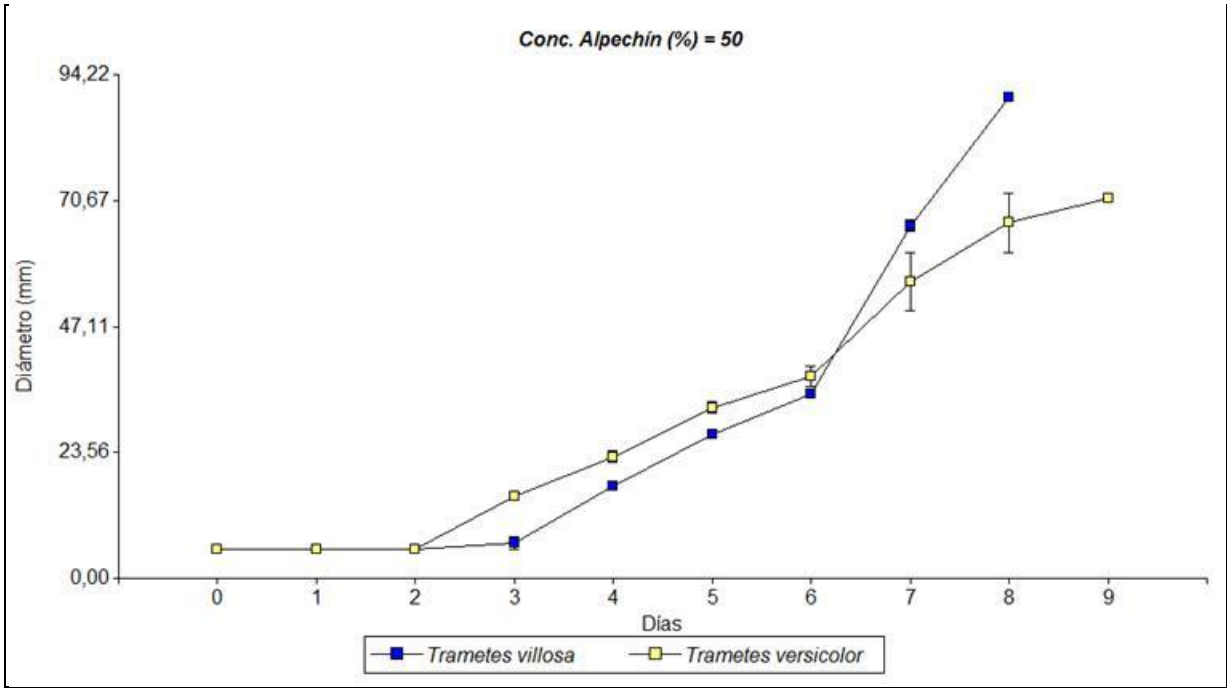
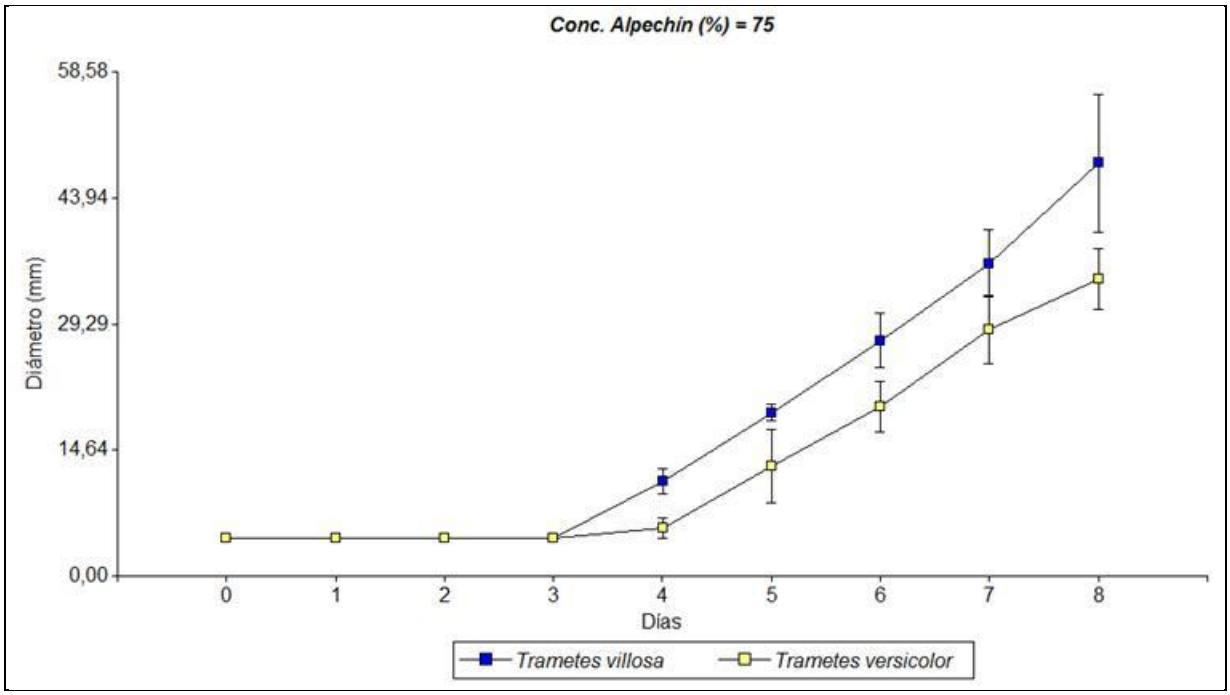


Ilustración 31. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo a una concentración de alpechín del 75 %



En la Ilustración 28 se observa que *P. rimosus* tiene un periodo de latencia de 5 días en medio AG. A la concentración del 25 % *P. rimosus* tuvo un periodo de latencia de 4 días y al cabo de 16 ocupó toda la placa (Ilustración 29). *T. villosa* y *T. versicolor* al cabo de 7 días ocuparon toda la placa.

A la concentración del 50 % las dos cepas que crecieron (*T. villosa y versicolor*) tuvieron un periodo de latencia de 2 días (Ilustración 30). El *T. villosa* ocupó toda la placa a los 9 días y *T. versicolor* a los 10 días.

A la concentración del 75 % las dos cepas que crecieron (*T. villosa y versicolor*) tuvieron un periodo de latencia de 3 días (Ilustración 31). *T. villosa* ocupó toda la placa a los 12 días y *T. versicolor* a los 15 días.

Las velocidades de crecimiento miceliar están resumidas en la Tabla 16. Los medios MA (Malta-Agar) y AG (Agar-ácido gálico) se utilizaron como control.

Tabla 16. Velocidades de crecimiento lineal del micelio (mm/día) para las 3 cepas de hongos ensayadas que crecen en MA, AG y sobre sustratos a base de medios de agar-diluciones de alpechín en diferentes concentraciones. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato					
	MA	AG	25 %	50 %	75 %	100 %
T. villosa	13,61 ± 0,85	8,80 ± 0,79	11,07 ± 0,94	6,53 ± 1,39	6,17 ± 1,17	n.c.d.
T. versicolor	14,12 ± 0,21	5,53 ± 0,69	10,77 ± 0,35	7,65 ± 0,25	3,80 ± 0,77	n.c.d.
P. rimosus	3,62 ± 0,2	2,91 ± 0,09	2,73 ± 1,83	n.c.d.	n.c.d.	n.c.d.

n.c.d.: no hay crecimiento detectado.

En medio MA, *T. villosa* y *T. versicolor* evidencian un crecimiento rápido (13,61 ± 0,85 y 14,12 ± 0,21 mm/día, respectivamente), presentando diferencias estadísticamente significativas con *P. rimosus* que lo hace en forma lenta (3,62 ± 0,2 mm/día).

En la Tabla 16 se observa que las velocidades máximas de crecimiento, en mm/día, para *T. villosa* y *T. versicolor* se obtienen para el medio MA (13,61 ± 0,85 mm/día y 14,12 ± 0,21 mm/día, respectivamente). En medio con alpechín las mayores velocidades máximas se obtienen al 25 % para *T. villosa* y *T. versicolor* (11,07 ± 0,94 mm/día y 10,77 ± 0,35 mm/día, respectivamente). Es necesario recordar que *P. rimosus* sólo creció a la concentración del 25 % de alpechín (2,73 ± 1,83 mm/día), donde presenta diferencias estadísticamente significativas con *T. villosa* y *T. versicolor*. *T. villosa* y *T. versicolor* en medios con alpechín sólo presentan diferencias estadísticamente significativas a la concentración del 75 % (Tabla 16).

Para *T. versicolor* los resultados alcanzados son el doble de los informados por Koutrotsios & Zervakis (2014).

Ilustración 32. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo de *Trametes villosa* a las distintas concentraciones de alpechín

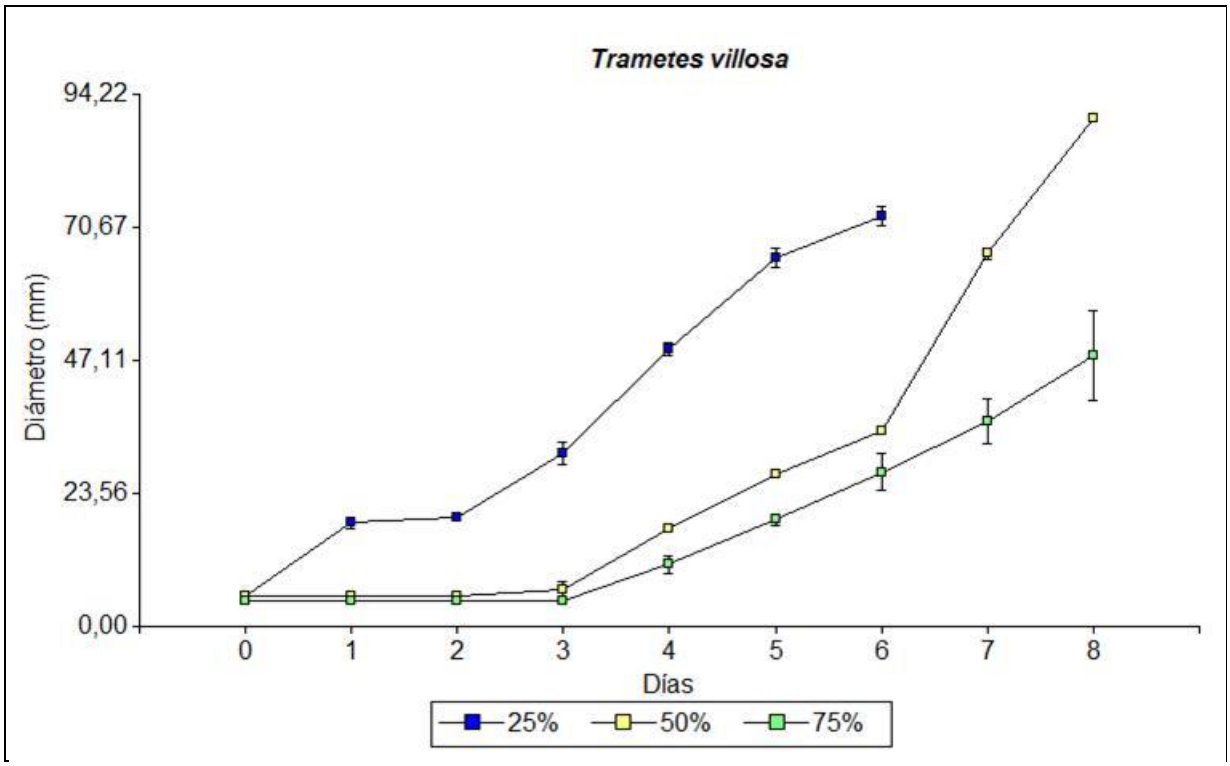
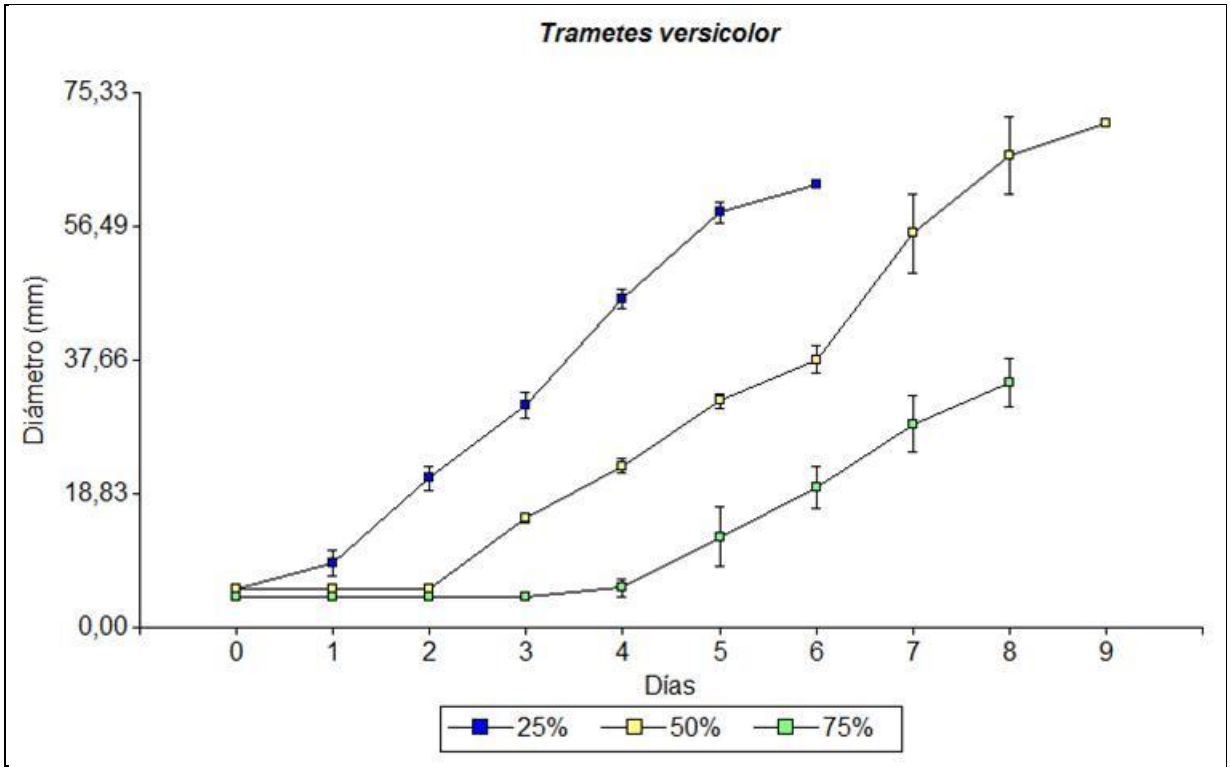


Ilustración 33. Crecimiento del micelio (diámetro) vs. tiempo de *Trametes versicolor* a las distintas concentraciones de alpechín



En las Ilustraciones Ilustración 32 y Ilustración 33 se puede comparar más claramente las distintas concentraciones de alpechín en las cepas de *T. villosa* y *T. versicolor* (respectivamente).

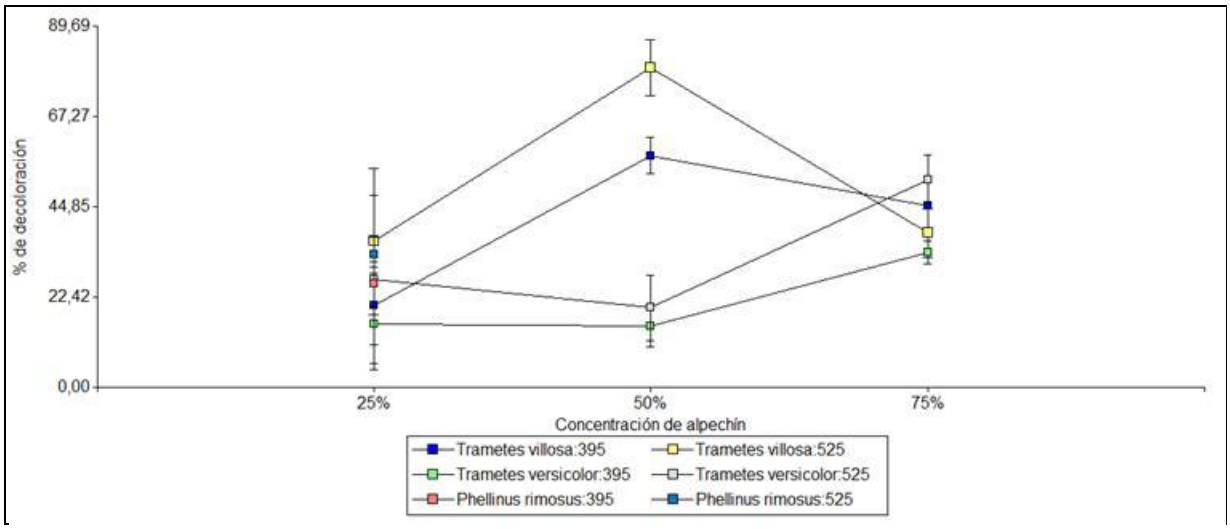
La decoloración de alpechín para las tres especies ensayadas se midió después de 5 a 7 días de crecimiento.

Tabla 17. Decoloración relativa (%) en sustrato de agar con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 5-7 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato							
	25 %		50 %		75 %		100 %	
	395 nm	525 nm	395 nm	525 nm	395 nm	525 nm	395 nm	525 nm
Trametes villosa	20,28 ± 16,86 %	36,26 ± 31,40 %	57,52 ± 7,85 %	79,37 ± 11,98 %	45,07 ± 1,35 %	38,50 ± 10,42 %	n.c.d.	
Trametes versicolor	15,74 ± 19,46 %	26,89 ± 26,5 %	15,18 ± 9,10 %	19,80 ± 14,04 %	33,52 ± 5,05 %	51,64 ± 10,38 %	n.c.d.	
Phellinus Rimosus	25,6 ± 9,677 %	32,86 ± 8,01 %	n.c.d.		n.c.d.		n.c.d.	

n.c.d.: no hay crecimiento detectado, ni decoloración.

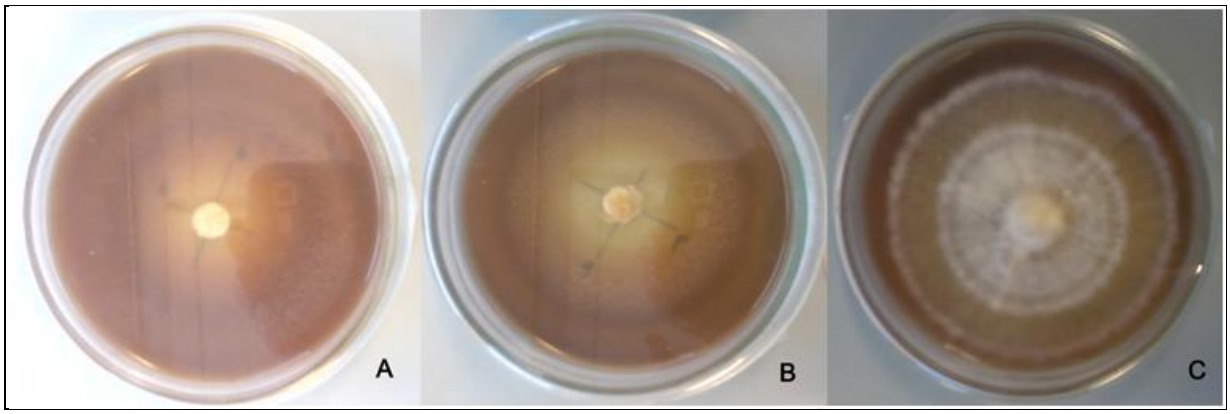
Ilustración 34. Decoloración (%) vs. concentración (%) de alpechín a las dos longitudes de onda ensayadas, 395 y 525 nm



De acuerdo a la Tabla 17 e Ilustración 17, *T. villosa* produjo el máximo porcentaje de decoloración a una concentración de alpechín del 50 % (57 % y 80 %) y la cepa de *T. versicolor* lo hizo para una concentración de alpechín del 25 % (30 % y 65 %). Estos resultados coinciden con las máximas velocidades de crecimiento miceliar.

Realizando un análisis de varianza se puede constatar que las medidas en las dos longitudes de onda de cada concentración no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Ilustración 35. Patrones de decoloración de las tres cepas ensayadas en alpechín al 25 %. A) *Trametes villosa*, B) *Trametes versicolor*, C) *Phellinus Rimosus*



Se puede advertir en la Ilustración 35 que *T. villosa* tiene un centro decolorado con crecimiento del hongo, después viene un halo oscuro y posteriormente se observa crecimiento del hongo blanco. *T. versicolor* presenta decoloración y crecimiento en el interior y el halo oscuro limitando éste. Por último en *P. rimosus* se puede observar claramente en la Ilustración 35 que no se observa halo oscuro solo crecimiento y decoloración en el interior.

Cuando se cambió la concentración de agar de 1,5 %, en el medio con alpechín, y se lo llevó al 11,5 %, el crecimiento de la cepa de *T. villosa* fue más definido (Ilustración 36). Se puede observar en la Ilustración 37 y la Tabla 18 que en todos los casos el crecimiento es superior cuando se trabaja con una mayor cantidad de agar, incluso permite un crecimiento al 100 % de alpechín. La limitación viene dada por la dificultad de trabajo con mayor cantidad de agar. Se registró una fase de latencia para todas las concentraciones de al menos un día, especialmente cuando se trabajó con un 100 % de alpechín, que fue de 3 días.

Ilustración 36 Crecimiento y decoloración de *Trametes villosa* a tres concentraciones de alpechín con el 11,5 % de agar

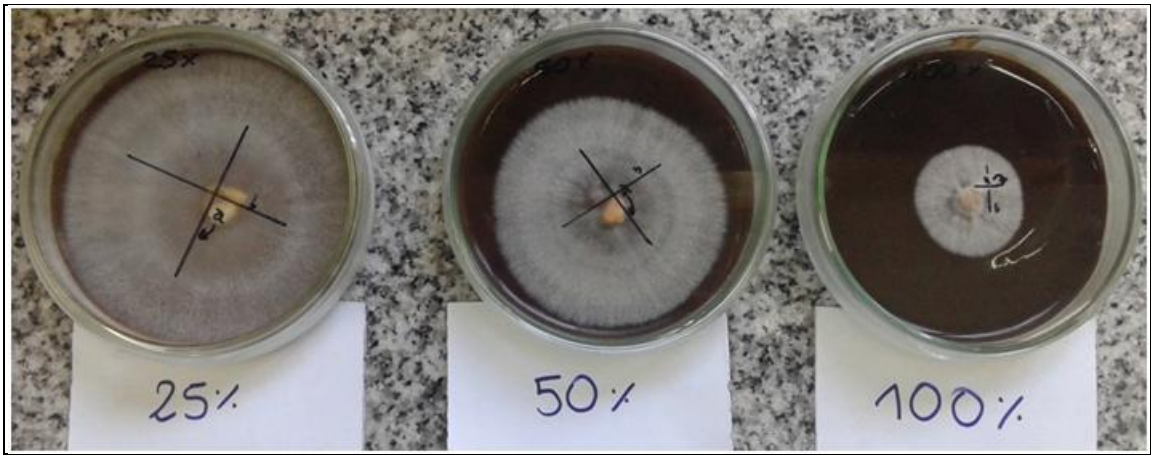
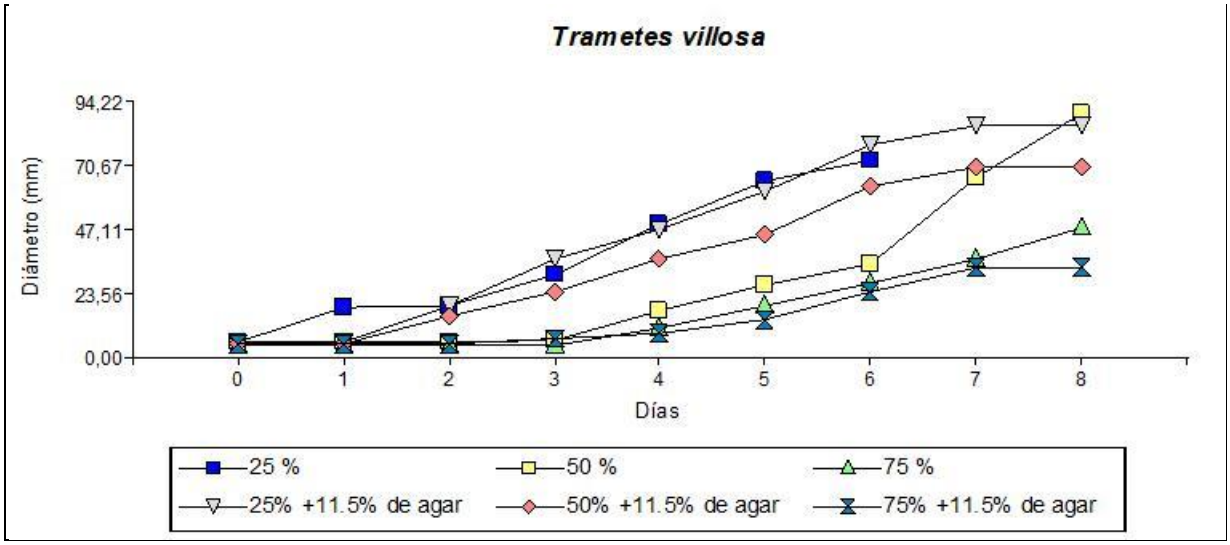


Tabla 18. Velocidad de crecimiento miceliar para *Trametes villosa* a distintas concentraciones de alpechín y porcentaje de agar. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato		
	25 %	50 %	100 %
Trametes villosa (1,5 % de agar)	11,61 ± 0,98	9,97 ± 1,86	No crece
Trametes villosa (11,5 % de agar)	12,22 ± 0,88	9,53 ± 0,63	4,02 ± 0,62

Ilustración 37. Diámetro de crecimiento vs. tiempo a distintas concentraciones de alpechín para todas las cepas y para la cepa de *Trametes villosa* datos con el 11,5 % de agar



3.4.2 Medio líquido con alpechín

En este punto se presentan los resultados obtenidos en el medio líquido preparado con las diluciones de alpechín del 20 al 100% (Ilustración 38), de acuerdo a lo descripto en el punto 2.4.4.2. Al finalizar, el tiempo de incubación, se determinó la actividad enzimática de lacasa, el porcentaje de decoloración del alpechín, la fitotoxicidad y el porcentaje de reducción de polifenoles.

Ilustración 38. Medio líquido con alpechín a distintas concentraciones

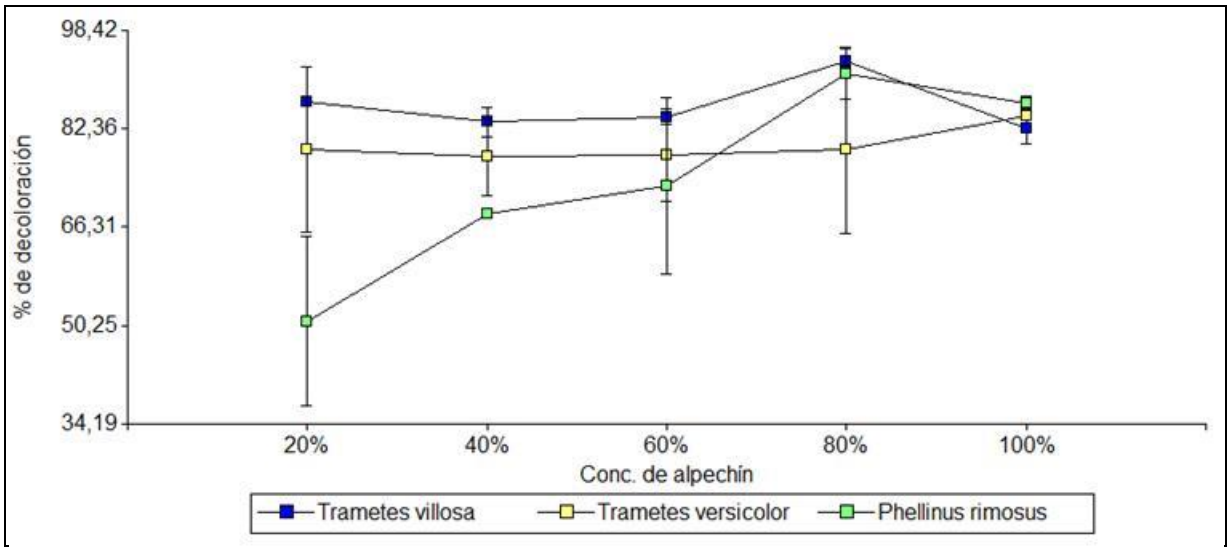
3.4.2.1 Determinación del color

A cada muestra se la diluyó adecuadamente para que se encuentre dentro del intervalo de medición del espectrofotómetro. Se midió la absorbancia a 525 nm. Los resultados se pueden observar en la Tabla 19 e Ilustración 39.

Tabla 19. Decoloración relativa (%) en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato				
	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
P. rimosus	50,94 ± 19,55	68,59 ± 0,93	73,05 ± 20,29	91,32 ± 5,91	86,64 ± 1,50
T. villosa	86,82 ± 0,55	83,46 ± 3,25	84,20 ± 1,47	93,30 ± 3,51	82,50 ± 3,54
T. versicolor	79,00 ± 19,07	77,75 ± 8,78	78,10 ± 10,74	78,92 ± 19,30	84,47 ± 0,94

Ilustración 39. Decoloración relativa (%) en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para los tres hongos ensayados a los 28 días de crecimiento



Durante el crecimiento del hongo en medios líquidos, el alpechín notablemente pierde color. El mayor porcentaje de decoloración se obtuvo al 80 % de alpechín en las cepas de *P. rimosus* y *T. villosa*. Para *T. versicolor* se obtuvo un máximo de decoloración de más del 80 % a una concentración del 100 % de alpechín. Se observa que la decoloración es proporcional a la concentración de alpechín para el caso de *P. rimosus* y en las otras dos cepas la decoloración se mantiene relativamente constante para todas las concentraciones de alpechín ensayadas.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en la decoloración entre las distintas cepas de hongos para cada concentración de alpechín.

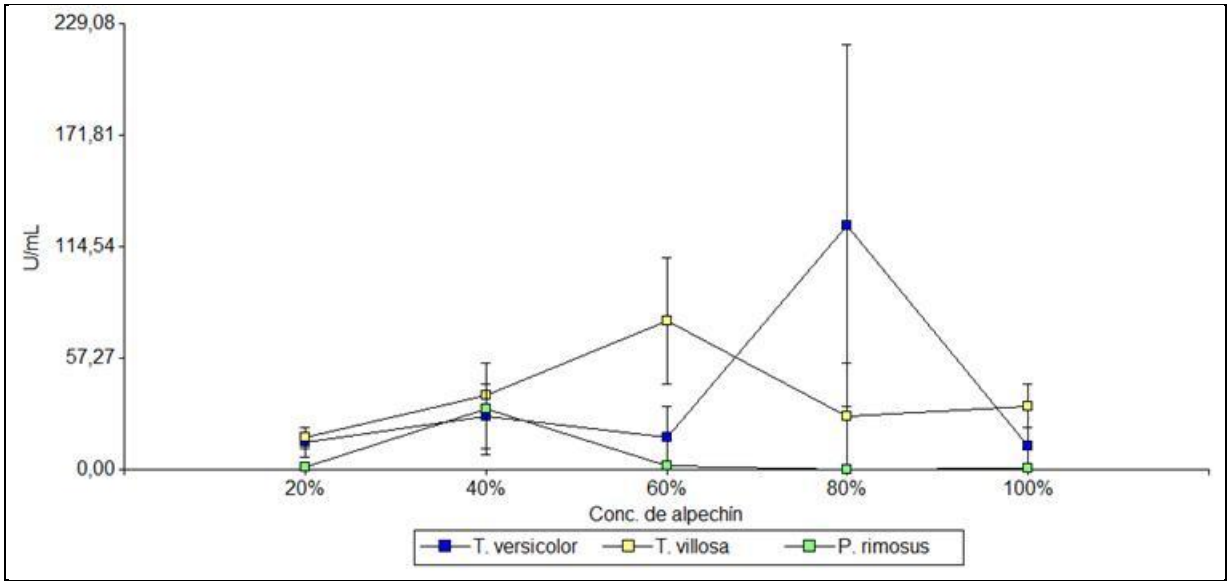
3.4.2.2 Valoración de la actividad enzimática

Para la medición de la actividad enzimática también realizada por triplicado se utilizó la técnica descrita en el punto 2.5 obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 20 e Ilustración 40.

Tabla 20. Actividad enzimática (U/L) en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato				
	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
P. rimosus	1,26 ± 0,06	31,10 ± 15,21	1,69 ± 2,23	0,17 ± 0,01	0,50 ± 0,08
T. villosa	16,37 ± 7,71	38,19 ± 7,71	76,37 ± 20,51	27,44 ± 10,51	32,73 ± 15,43
T. versicolor	14,19 ± 6,12	27,28 ± 10,75	16,42 ± 7,04	125,45 ± 50,21	12,00 ± 5,42

Ilustración 40. Actividad enzimática en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para los tres hongos ensayados a los 28 días de crecimiento



Las mayores actividades enzimáticas que se registraron para *P. rimosus*, *T. villosa* y *T. versicolor* lo fueron a concentraciones de alpechín del 40, 60 y 80 % respectivamente.

No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los valores resultantes de las 3 cepas de hongos ensayadas para cada concentración de alpechín.

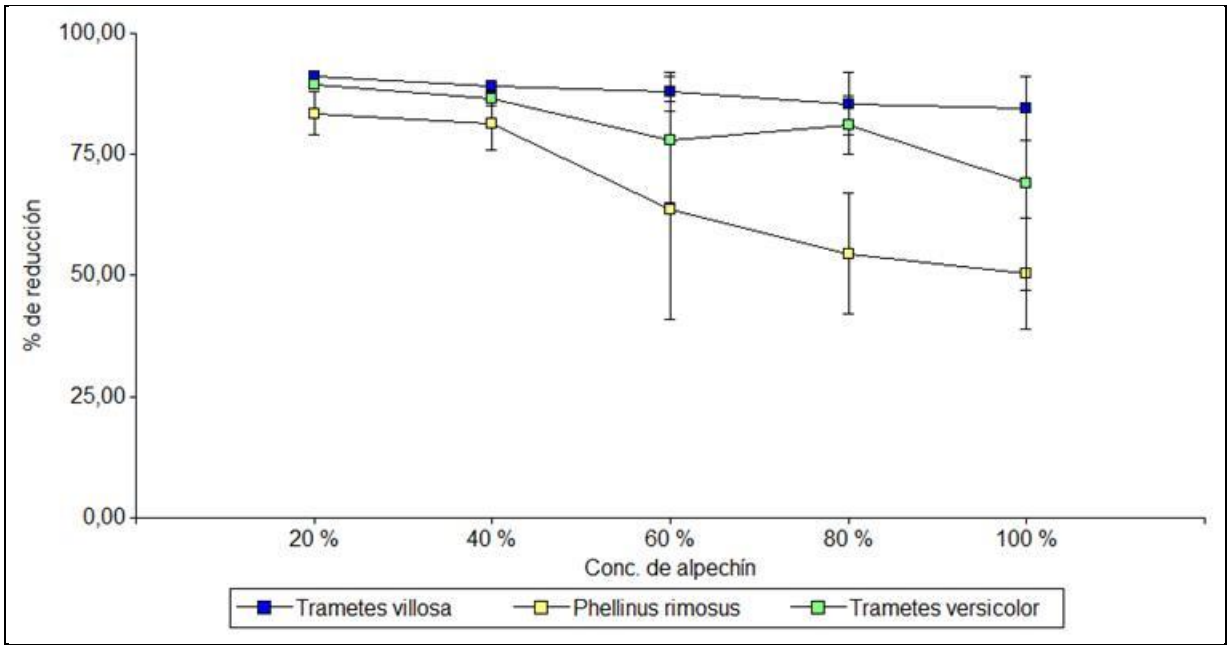
3.4.2.3 Determinación de los polifenoles totales

Los resultados de reducción del contenido de polifenoles se calcularon tomando como referencia el contenido de polifenoles del alpechín sin tratar en la dilución correspondiente y se expresó en tanto por ciento (Tabla 21 e Ilustración 41).

Tabla 21. Reducción relativa (%) de la concentración de los polifenoles totales en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato				
	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
T. villosa	91,00 ± 0,00	89,00 ± 0,00	88 ± 5,66	85,50 ± 9,19	84,50 ± 9,19
P. rimosus	83,50 ± 6,36	81,50 ± 7,78	63,50 ± 31,82	54,50 ± 17,68	50,50 ± 17,68
T. versicolor	89,50 ± 0,71	86,50 ± 2,12	78,00 ± 18,38	81,00 ± 8,49	69,00 ± 31,11

Ilustración 41. Reducción relativa (%) de la concentración de polifenoles en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín para los tres hongos ensayados a los 28 días de crecimiento



La mayor reducción del contenido de polifenoles se observa para *T. villosa* y *T. versicolor*, 91 % y 90 % respectivamente, a la concentración de alpechín del 20 % para ambos. Para *P. rimosus* la máxima reducción del contenido de polifenoles también se alcanza al 20 % de alpechín, siendo de 83 % para esta concentración. Para *T. versicolor* y *P. rimosus* la variación observada en la reducción de polifenoles a lo largo de las distintas concentraciones es mayor que en *T. villosa*.

No existe diferencia estadísticamente significativa para cada concentración de alpechín en los valores obtenidos para las 3 cepas de hongos ensayadas.

De la observación de la Tabla 21 se puede deducir que al aumentar la concentración del alpechín el efecto de degradación de las tres cepas ensayadas va haciéndose en general menor. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, & Garrido Hoyos (1992) para el alpechín tratado con *Aspergillus terreus*. Estos autores estudiaron la degradación de alpechines con *Aspergillus terreus* en condiciones de aerobiosis y temperatura de 28 °C, utilizando como parámetro el contenido fenólico e identificaron los compuestos fenólicos que representan el 90% de la carga total de fenoles presentes en el alpechín.

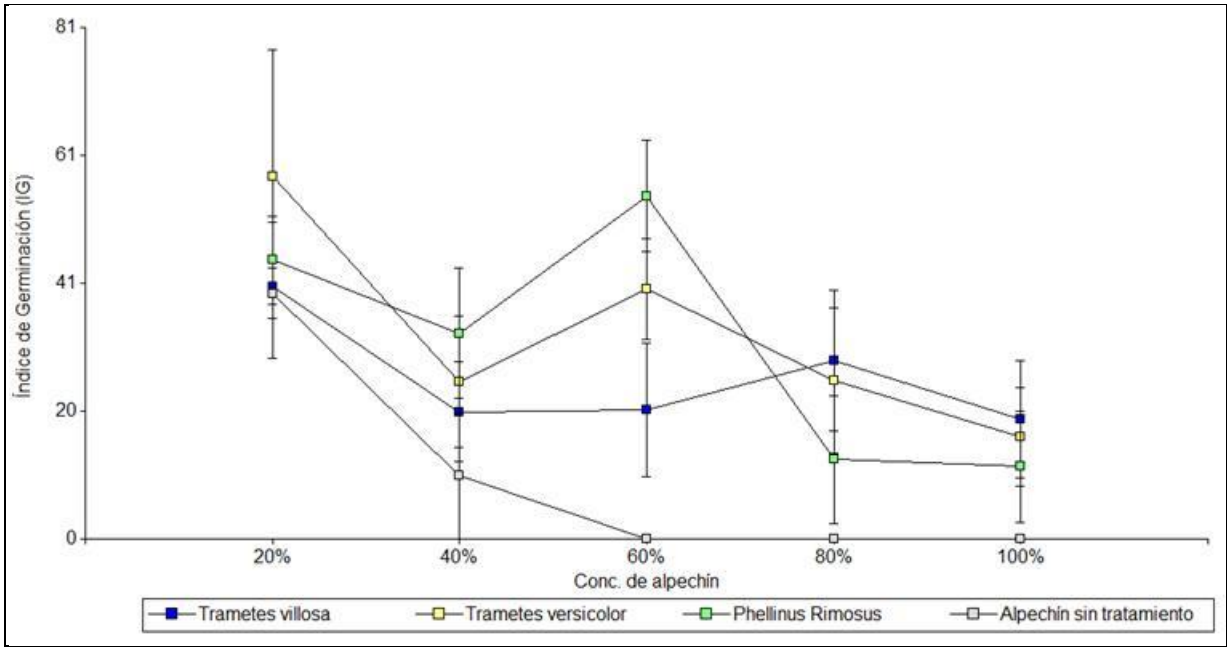
3.4.2.4 Fitotoxicidad

En la Ilustración 42 y la Tabla 22 se presentan los resultados de Índice de germinación en función de las diferentes concentraciones de las soluciones de alpechín (20, 40, 60, 80, 100 %) tratadas con las distintas cepas de hongos.

Tabla 22. Fitotoxicidad referida como Índice de germinación de la semilla de *Lactuca sativa* en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín tratado con las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Especie de hongo	Sustrato				
	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
T. villosa	39 ± 0,00	20 ± 14,85	20 ± 26,87	28 ± 13,44	19 ± 1,41
P. rimosus	44 ± 6,36	33 ± 24,75	54 ± 18,38	12 ± 12,02	11 ± 9,19
T. versicolor	58 ± 17,68	25 ± 25,46	40 ± 2,12	25 ± 25,46	16 ± 22,63
Alpechín sin tratamiento	39 ± 0,00	10 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00

Ilustración 42. Fitotoxicidad referida como Índice de germinación de la semilla de *Lactuca sativa* en medio líquido con diferentes concentraciones de alpechín tratado con las 3 cepas de hongos ensayadas a los 28 días de crecimiento.



Comparados los resultados en cada concentración de alpechín de las 3 cepas de hongos ensayadas y el alpechín sin tratamiento, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para una concentración superior al 60 % de alpechín los medios tratados con cualquiera de las cepas dieron un Índice de germinación positivo frente al alpechín sin tratamiento en el cual no se observó germinación, indicando que la fitotoxicidad disminuye con el tratamiento fúngico.

3.4.2.5 Correlación de los parámetros analizados

En las Tablas Tabla 23, Tabla 24 y Tabla 25, se resumen los valores obtenidos de los parámetros que se correlacionaron para cada hongo.

Tabla 23. Resultados obtenidos para los parámetros analizados a diferentes concentraciones de alpechín tratado con *Trametes villosa*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Concentración de alpechín/Parámetros	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
Decoloración relativa (%)	86,82 ± 0,55	83,46 ± 3,25	84,20 ± 1,47	93,30 ± 3,51	82,50 ± 3,54
Actividad de lacasa (U/L)	16,37 ± 7,71	38,19 ± 7,71	76,37 ± 20,51	27,44 ± 10,51	32,73 ± 15,43
Reducción de polifenoles (%)	91,00 ± 0,00	89,00 ± 0,00	88 ± 5,66	85,50 ± 9,19	84,50 ± 9,19
Índice de germinación (fitotoxicidad)	39 ± 0,00	20 ± 14,85	20 ± 26,87	28 ± 13,44	19 ± 1,41

Tabla 24. Resultados obtenidos para los parámetros analizados a diferentes concentraciones de alpechín tratado con *Trametes versicolor*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Concentración de alpechín/Parámetros	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
Decoloración relativa (%)	79,00 ± 19,07	77,75 ± 8,78	78,10 ± 10,74	78,92 ± 19,30	84,47 ± 0,94
Actividad de lacasa (U/L)	14,19 ± 6,12	27,28 ± 10,75	16,42 ± 7,04	125,45 ± 50,21	12,00 ± 5,42
Reducción de polifenoles (%)	89,50 ± 0,71	86,50 ± 2,12	78,00 ± 18,38	81,00 ± 8,49	69,00 ± 31,11
Índice de germinación (fitotoxicidad)	58 ± 17,68	25 ± 25,46	40 ± 2,12	25 ± 25,46	16 ± 22,63

Tabla 25. Resultados obtenidos para los parámetros analizados a diferentes concentraciones de alpechín tratado con *Phellinus rimosus*. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de las medias, n=3

Concentración de alpechín/Parámetros	20 %	40 %	60 %	80 %	100 %
Decoloración relativa (%)	50,94 ± 19,55	68,59 ± 0,93	73,05 ± 20,29	91,32 ± 5,91	86,64 ± 1,50
Actividad de lacasa (U/L)	1,26 ± 0,06	31,10 ± 15,21	1,69 ± 2,23	0,17 ± 0,01	0,50 ± 0,08
Reducción de polifenoles (%)	83,50 ± 6,36	81,50 ± 7,78	63,50 ± 31,82	54,50 ± 17,68	50,50 ± 17,68
Índice de germinación (fitotoxicidad)	44 ± 6,36	33 ± 24,75	54 ± 18,38	12 ± 12,02	11 ± 9,19

Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las distintas variables determinadas: decoloración relativa, actividad de lacasa, reducción de polifenoles, Índice de germinación (fitotoxicidad) para cada una de las cepas estudiadas. Los coeficientes de correlación y los valores de significancia del test estadístico (p-valor) se muestran en forma de lista en las TablasTabla 26, Tabla 27 y Tabla 28.

Tabla 26. Coeficientes de correlación de Pearson (R) y sus valores de significancia (p-valor) para *Phellinus rimosus,* n= 3

Variable(1)	Variable(2)	R	p-valor
Decoloración relativa	Actividad de lacasa	-0,22	0,7174
Decoloración relativa	Reducción de polifenoles	-0,91	0,0322
Decoloración relativa	Índice de germinación	-0,75	0,1461
Actividad de lacasa	Reducción de polifenoles	0,57	0,3165
Actividad de lacasa	Índice de germinación	0,11	0,8631
Reducción de polifenoles	Índice de germinación	0,62	0,2624

Tabla 27. Coeficientes de correlación de Pearson (R) y los valores de significancia (p-valor) para *Trametes versicolor*, n= 3

Variable(1)	Variable(2)	R	p-valor
Decoloración relativa	Actividad de lacasa	-0,22	0,7171
Decoloración relativa	Reducción de polifenoles	-0,78	0,1196
Decoloración relativa	Índice de germinación	-0,48	0,4078
Actividad de lacasa	Reducción de polifenoles	0,06	0,9220
Actividad de lacasa	Índice de germinación	-0,29	0,6415
Reducción de polifenoles	Índice de germinación	0,66	0,2222

Tabla 28. Coeficientes de correlación de Pearson (R) y los valores de significancia (p-valor) para *Trametes villosa*, n= 3

Variable(1)	Variable(2)	R	p-valor
Decoloración relativa	Actividad de lacasa	-0,13	0,8299
Decoloración relativa	Reducción de polifenoles	0,18	0,7670
Decoloración relativa	Índice de germinación	0,54	0,3502
Actividad de lacasa	Reducción de polifenoles	-0,07	0,9100
Actividad de lacasa	Índice de germinación	-0,64	0,2469
Reducción de polifenoles	Índice de germinación	0,52	0,3672

Para *P. rimosus* (Tabla 26) se observa una correlación lineal inversa, por el signo negativo, cuando la variable 1 es decoloración relativa y la variable 2 es reducción de polifenoles. Como el valor de p es menor a 0,05 se rechaza la hipótesis nula por lo tanto existe evidencia de correlación entre las variables. Además como el valor absoluto de R (coeficiente de Pearson) se encuentra entre 0,8 y 1 la correlación entre las variables es muy alta. También se advierten altos valores positivos del coeficiente de Pearson entre la actividad enzimática y la reducción de polifenoles (R= 0,57) y entre la reducción de polifenoles y la fitotoxicidad (R= 0,62) para este hongo.

Para *T. versicolor* y *T. villosa* (TablasTabla 27 y Tabla 28) no se observan evidencias significativas de que existan correlaciones entre las variables.

Aunque existen altos valores positivos del coeficiente de Pearson para *T. versicolor* entre las variables de reducción de polifenoles y fitotoxicidad (R= 0,66) y para *T. villosa* entre las variables de decoloración relativa y fitotoxicidad (R= 0,54) y entre la reducción de polifenoles y la fitotoxicidad (R= 0,52).

También presentan altas correlaciones inversas la decoloración relativa y el índice de germinación para *P. rimosus* (R= -0,75), la decoloración relativa y la reducción de polifenoles (R= -0,78) para *T. versicolor*, y por último la actividad de lacasa y el Índice de germinación (R= -0,64) para *T. villosa*.

4. Discusión

De acuerdo a lo advertido en las pruebas realizadas con ácido gálico y con colorante RBlue 220, se concluye que es necesario efectuar ensayos preliminares en estos dos medios para afirmar o asegurar que los hongos con los que se trabaja producen enzimas fenol-oxidasas, tales como lacasas. Esto se ve claramente en el caso de *T. versicolor* en donde se observa decoloración apreciable en el medio con ácido gálico pero no en el medio con el colorante. Sasek, Novotny, & Vampola (1998) ya habían observado que algunas especies de hongos no poseían la misma capacidad decolorante, algunos decoloran en todos los medios, otros decoloran solamente cuando están bien desarrollados, y una parte de ellos decoloran sólo en medios de nutrientes limitados.

En los ensayos de decoloración se observó que todas las zonas decoloradas eran más pequeñas que los diámetros de las colonias correspondientes, de conformidad con el hecho de que la decoloración es una actividad metabólica secundaria del micelio mayor. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Levin, Papinutti & Forchiassin (2004), los cuales investigaron la capacidad de decoloración de 26 hongos de pudrición blanca de Argentina.

Las tres cepas de hongos de pudrición blanca de la madera ensayadas en este estudio son productoras de enzimas ligninolíticas siendo la cepa de *P. rimosus* la que tiene mayor producción enzimática en relación con su crecimiento para los dos

medios utilizados (Czapek-Dox modificado y Kirk modificado) aunque esta cepa demostró ser la de crecimiento más lento, comparado con las otras dos.

Por otro lado, se cultivó en dos medios distintos, Kirk modificado y Czapek-Dox modificado, concluyendo que no todas las cepas de hongos presentan el mismo comportamiento para los diferentes medios. Para *T. versicolor* y *T. villosa* resulta más favorable el medio Czapek-Dox modificado y, en cambio, para *P. rimosus* el de Kirk modificado. En cuanto a los valores de actividad enzimática máxima producida en estos medios, se pudo observar que los valores de *T. versicolor* y *T. villosa* son similares y muy superiores, entre un 16 a un 20 %, a los de *P. rimosus*. También se pudieron observar los tiempos de máxima producción de lacasa de las distintas cepas arrojando como resultado un mínimo de 24 días.

Estos datos serán útiles e importantes para el diseño de un biorreactor, en el futuro.

Las tres cepas de hongos de pudrición de la madera seleccionadas para los fines de este estudio fueron capaces de crecer en medio sólido de alpechín/agar y producir decoloración aunque se registró una “fase lag” (enlentecimiento en el desarrollo inicial) para todas las cepas. Esta etapa aumentó a medida que se incrementaba la concentración de alpechín, resultados coincidentes con lo mencionado por Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis (1997), para distintas cepas de *Pleurotus* y de ellas las de *Pleurotus cornucopiae* y *Pleurotus ostreatus* resultaron las más eficientes.

Se observó crecimiento franco de la cepa de *P. rimosus* sólo para la menor concentración (25 %) de alpechín. Las de *T. versicolor* y *T. villosa* lo hicieron también para concentraciones mayores (25, 50 y 75 %), evidenciándose así un mayor efecto inhibitorio del desarrollo en *P. rimosus* por efecto del aumento de la concentración de alpechín. Esto concuerda con la bibliografía consultada, que sugiere trabajar a una concentración del 25 % del sustrato (Koutrotsios & Zervakis, 2014; Ehaliotis, Papadopoulos, Kotsou, Mari, & Balis, 1999). También se mostró el efecto inhibitorio (alargamiento del período de latencia-“fase lag”) por aumento de la concentración de alpechín en las otras dos cepas utilizadas en este estudio, *T. villosa* y *T. versicolor*.

En las tres cepas ensayadas el fenómeno de decoloración del alpechín se evidenció más lentamente que el crecimiento radial del micelio, lo que ya había sido observado por Flouri, Sotirchos, Ioannidou, & Balis (1997) aunque los porcentajes de

decoloración obtenidos en este trabajo, con las tres cepas, son superiores a los indicados por los mismos autores.

Las velocidades de crecimiento del micelio resumidas en la Tabla 16, permiten comparar los distintos medios. Para todas las cepas de las distintas especies de hongo los valores con el medio malta–agar (MA) se observan similares a los valores del medio preparado con un 25 % de alpechín, siendo menores los resultados para las restantes concentraciones. Se observa que los valores obtenidos con las distintas concentraciones de alpechín son todos superiores a los resultantes con Agar-ácido gálico (AG). De lo anterior, se concluye que el alpechín a la concentración del 25 % es un sustrato similar a la malta–agar y que es superior en todas las concentraciones al Agar-ácido gálico. De acuerdo a los resultados obtenidos, las máximas decoloraciones tanto de *T. villosa* como de *T. versicolor* coinciden con las máximas velocidades de crecimiento del micelio.

Se observaron también diferencias cualitativas en los patrones de decoloración entre las distintas cepas, particularmente entre *T. villosa* y las otras dos cepas (Ilustración 35).

Durante el crecimiento del hongo en medios líquidos, con distintas concentraciones de efluente y el medio mínimo de mantenimiento (MMM), el alpechín notablemente pierde color. El mayor porcentaje de decoloración se obtuvo al 80 % de alpechín en las cepas de *P. rimosus* y *T. villosa*. Para *T. versicolor* se obtuvo un máximo a una concentración del 100 %. Estos valores fueron mayores al 80 % de decoloración y por lo tanto superiores a los informados por Martirani, Giardina, Marzullo, & Sannia (1996).

La mayor actividad enzimática se obtuvo para *T. villosa* a una concentración de alpechín del 60 %, mientras que para *T. versicolor* fue del 80 % y para *P. rimosus* del 40 %. Siendo las actividades enzimáticas de las dos primeras variedades superior que la de *P. rimosus*, tal como se observó para los medios líquidos anteriores ensayados, Kirk modificado y Czapek-Dox modificado. La mayor reducción del contenido de polifenoles se observa para todas las cepas a la concentración de alpechín del 20 % para ambos. Aunque no llega al valor obtenido por Maestro Durán, Borja Padilla, Martín Martín, Fiestas Ros de Ursinos, & Alba Mendoza (1991) del 99% de biodegradación. No obstante, de la observación de la

Tabla 21 se puede deducir que al aumentar la concentración del alpechín el efecto de degradación de las tres cepas ensayadas va haciéndose en general menor. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Martínez Nieto, Ramos Cormenzana, Pareja, y Garrido Hoyos (1992) para el alpechín tratado con *Aspergillus terreus*, o lo indicado por Gianfreda, Sannino, Filazzola, & Leonowicz (1998) que mostraron que una lacasa de *Cerrena unicolor* fue capaz de oxidar diferentes sustancias fenólicas que normalmente están presentes en alpechines e indicaron que los porcentajes de oxidación variaban entre 60 y 100 % después de 24 h de incubación.

Cuando D´Annibale, Stazi, Vinciguerra, Di Mattia, & Giovannozzi Sermanni (1999) y D´Annibale, Stazi, Vinciguerra, & Giovannozzi Sermanni (2000) utilizaron una lacasa del hongo de podredumbre blanca de la madera, *Lentinula edodes* inmobilizada sobre quitosano u oxirano, encontraron que se obtuvo una decoloración parcial también con una disminución del contenido de polifenoles y ortodifenoles, todo ello combinado con una disminución en la toxicidad del efluente.

En cuanto a la fitotoxicidad, los resultados muestran diferentes respuestas de sensibilidad de la lechuga a las distintas concentraciones del efluente tratado por las especies consideradas. Al 20 % de la concentración de alpechín prácticamente no se observa diferencia en los índices de germinación de las semillas cuando se compara entre el medio con alpechín sin tratamiento y el medio con alpechín tratado con *T. villosa*, si con respecto a las otras dos cepas. Después se va ampliando la diferencia existiendo la máxima brecha para *T. villosa* a la concentración de 80 % de alpechín.

Se puede concluir que se observa un notable aumento de los índices de germinación para las concentraciones superiores al 20 % de alpechín trabajado con alguna de las cepas en estudio comparado con el alpechín sin tratamiento. *P. rimosus* y *T. versicolor*, presentan su máxima diferencia a la concentración 60 % de alpechín. Se observan valores superiores a 50 para el Índice de germinación únicamente para *P. rimosus* a la concentración del 60 % y para *T. versicolor* a la concentración del 20 %. Para una concentración superior al 60 % de alpechín los medios cultivados con cualquiera de las cepas dieron un Índice de germinación positivo indicando que la fitotoxicidad disminuye con el tratamiento fúngico.

Casa, D'Annibale, Pieruccetti, Stazi, Sermanni & Lo Cascio (2003) también investigaron el potencial de la lacasa de *L. edodes* para remover la fitotoxidad de alpechines. Ellos realizaron ensayos de germinación sobre trigo en la presencia de diferentes diluciones de alpechines crudos y tratados con lacasa. Los tratados con lacasa resultaron en un 65 y 86 % de reducción en el total de fenoles y ortodifenoles respectivamente. La germinación en el trigo se incremento un 57 % cuando la dilución era 1: 8 y por 94 % a una dilución 1:2, cuando comparado con alpechín sin tratar.

Quarantino, D´Annibale, Federici, Cereti, Rossini, & Fenice (2007) indicaron que los fenoles eran los principales determinantes de la fitotoxidad de los alpechines y mostraron que utilizando una preparación comercial de lacasa (DeniLite, Novo Nordisk, Denmark) el producto tratado podría ser muy promisorio para el uso seguro de estos efluentes en el ámbito agronómico.

Realizando un análisis de correlación lineal de Pearson para las variables determinadas en el medio líquido de alpechín con MMM a las distintas concentraciones, se observa para *P. rimosus* una alta correlación lineal inversa significativa de la decoloración relativa con la reducción de polifenoles, es decir que a medida que aumenta la decoloración relativa disminuye la reducción en el contenido de polifenoles.

5. Conclusiones

Del presente trabajo, se puede concluir, que las tres cepas de hongos ensayadas se comportan como buenas degradadoras de compuestos fenólicos, observándose no obstante una disminución de su acción degradadora y un efecto inhibidor en el crecimiento del hongo al aumentar la concentración de alpechín. Por lo tanto es factible pensar que el alpechín tratado posea una menor capacidad antimicrobiana para su deposición final o completar su tratamiento en lechos bacterianos.

6. Perspectivas futuras

En este trabajo se muestra que la lacasa tiene un gran potencial en la aplicación de varias áreas de la industria alimentaria. Sin embargo, una de las limitaciones para la

implementación a gran escala de las lacasas es la falta de capacidad de producción de importantes volúmenes de la enzima altamente activos a un precio asequible. El uso de fuentes de bajo costo para la producción de lacasa se está estudiando en los últimos tiempos. En este sentido, un campo emergente en la gestión de las aguas residuales industriales está explotando su potencial nutricional para la generación de enzimas lacasa. Además de los residuos sólidos, aguas residuales de la industria de procesamiento de alimentos son prometedoras en particular para eso.

7. Bibliografía

Alcalde, M. (2007). Lacasses: biological functions, molecular structure and industrial applications. En J. Polaina, & A. P. MacCabe (Edits.), *Industrial Enzymes* (págs. 461-476). Springer. Madrid, España.

Alcalde, M., Bulter, T., & Arnold, F. H. (2002). Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening, 7* (6), 547-553.

Alcalde, M., Bulter, T., Zumárraga, M., García-Arellano, H., Mencía, M., Plou, F. J., y otros. (2005). Screening mutant libraries of fungal laccases in the presence of organic solvents. *Journal of Biomolecular Screening, 10* (6), 624-631.

Andreozzi, R., Longo, G., Majone, M., & Modesti, G. (1998). Integrated treatment of olive oil mill effluents (OME): Study of ozonation coupled with anaerobic digestion. *J. Wat. Res., 32* (8), 2357-2364.

Awad, A., Salman, H., & Hung, Y.-T. (2006). Tratamiento de residuos de aceite de oliva. *Tratamiento de los residuos de la industria del procesado de alimentos*, 147-237. (L. K. Wang, Y.-T. Hung, H. H. Lo, & C. Yapijakis, Edits.) Acribia S.A. Zaragoza, España.

Bajpai, P. (2004). Biological bleaching or chemical pulps. *Crit. Rev. Biotechnol., 24*, 1-58.

Beltrán de Heredia Alonso, J., Torregrosa Antón, J., & García Rodríguez, J. y. (2000). Tratamiento con ozono de las aguas residuales de la almazara. *Grasas y aceites, 51* (5), 301-306.

Benitez, J., Beltrán-Heredia, J., Torregosa, J., Acero, J. L., & Cercas, V. (1997). Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (47), 185-188.

Benjamin, M. M., Wood, S. L., & Ferguson, J. F. (1984). Anaerobic toxicity and biodegradability of pulp mill waste constituents. *Water Res., 18*, 601-607.

Borja Padilla, R., Alba Mendoza, J., & González Becerra, A. (1992). Estudio cinético de la digestión anaerobia de alpechin procedente de la extracción de aceite utilizando olive, previamente biotratado con *Geotrichum Candidum*. *Grasas y Aceites, 43* (4), 219-225.

Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *267* (1), 99-102.

Bulter, T., Alcalde, M., Volker, S., Meinhold, P., & Schlachtbauer, C. (2003). Functional expression of a fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Applied and environmental microbiology, 69* (2), 987-995.

Cáceres, R., Novello, R., & Robert, M. (Noviembre de 2009). *Análisis de la cadena del olivo en la Argentina .Proyecto Específico 2742: Economía de las Cadenas Agroalimentarias y Agroindustriales*. (Instituto Nacional de Tecnología Agroindustrial). Recuperado el 10/02/2015, de http://inta.gob.ar/documentos/analisis-de-la-cadena-del-olivo-en-argentina/at_multi_download/file/olivo_2742.pdf

Call, H. P., & Mucke, L. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). *J. Biotechnol., 53*, 163-20253.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient Laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and environmental microbiology, 71* (4), 1775–1784.

Casa, R., D´Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S. R., Sermanni, G. G., Cascio, L., y otros. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum Desf.*) germinability. *Chemosphere, 50* (8), 959–966.

Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación. (Setiembre de 2011a). Demandas tecnológicas y necesidades del sector oleícola español para el tratamiento de aguas residuales. *Monográfico RE-WASTE [en línea], 49* , 44. España. Recuperado el 16/07/2014, de http://www.ctnc.es/udownfile.php?extfile=16328&id=66

Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación. (Setiembre de 2011b). Oferta de tecnologías sostenibles para la reutilización de residuos y/o subproductos de las almazaras y orujeras.Oferta de tecnologías sostenibles para la reutilización de residuos y/o subproductos de las almazaras. *Monográfico RE-WASTE [en línea] , 49*, 32-34. España. Recuperado el 16/07/2014, de http://www.ctnc.es/udownfile.php?extfile=16328&id=66

Collins, P. J., Kotterman, M. J., Field, J. A., & Dobson, A. D. (1996). Oxidation of Anthracene and Benzo[a]pyrene by Laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and environmental microbiology, 62* (12), 4563-4567.

Cripps, C., Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology, 56* (4), 1114–1118.

D´Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., & Giovannozzi Sermanni, G. (2000). Oxirane-immobilized Lentinula edodes laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology, 77* (2-3), 265–273.

D´Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., & Giovannozzi Sermanni, G. (1999). Characterization of immobilized laccase from Lentinula edodes and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry, 34* (6-7), 697–706.

Davidson, R. W., Campbell, W. A., & Blaisdell, D. J. (1938). Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *Journal of Agricultural Research, 57* (9), 683-685.

Di Giovacchino, L., Mascolo, A., & Seghetti, L. (1988). Sulle caratteristiche delle acque di vegetazione delle olive. Nota II. *Riv. Ital. Sostanze Grasse, 65*, 481-488.

Duarte Castro, D. E. (2009). Determinación de la concentración de inhibición media (CE50) de cobre y niquel para la semilla Lactuca Sativa mediante ensayos de toxicidad. *Tesis de Grado para Optar al Título de Ingeniera Ambiental y Sanitaria. Universidad de La Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria*. Bogotá, Colombia.

Duran, N., Rosa, M. A., D´Annibale, A., & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccase and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb.Technol., 31*, 907-931.

Ehaliotis, C., Papadopoulos, K., Kotsou, M., Mari, I., & Balis, C. (1999). Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol., 30*, 301-311.

Esteva, M. (Agosto-Setiembre de 2014). *Agropostonline.* (A. A. El Consejo de Profesionales del Agro, Ed.) Recuperado el 29/02/2016, de Agropostonline, de http://www.cpia.org.ar/agropost/201408/nota5.html.

Felby, C., Hassingboe, J., & Lund, M. (2002). Pilot scale production of fiberboards made by laccase oxidized wood fibers: board properties and evidence for cross-linking of lignin. *Enzyme Microb. Technol., 31*, 736-741.

Field, J. A., Lettinga, G., & Geurts, M. (1987). The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of potato starch wastewater phenolic amino acids. *Biological Wastes, 21*, 37-54.

Fiestas, J., Martin, A., & Borja, R. (1990). Influence of inmovilization supports on the kinetic constants of anaerobic purification of olive mill waste water. *Biological Wastes, 33*, 131-142.

Flouri, F., Sotirchos, D., Ioannidou, S., & Balis, C. (1997). Decolorization of Olive Oil Mill Liquid Wastes by Chemical and Biological Means. *International Biodetcrioration & Biodegradation*, 189-192.

Freire, R. S., Ferreira, M. M., Duran, N., & Kubota, L. (2002). Development of laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent. *Anal. Chim. Acta, 463*, 329-238.

Freire, R. S., Ferreira, M. M., Duran, N., & Kubota, L. (2003). Dual amperometric biosensor device for analysis of binary mixtures of phenols by multivariate calibrations using partial least squares. *Anal. Chim. Acta, 485*, 263-269.

Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M. T., & Leonowicz, A. (1998). Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain Cerrena unicolor. *Journal of Molecular Catalysis B., 4* (1-2), 13–23.

Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Lacasses: A usefull group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J., 3*, 1-25.

González, M. D., Moreno, E., Quevedo-Sarmiento, J., & Ramos-Cormenzana, A. (1990). Studies on antibacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin): inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere, 20*, 423-432.

Heinfling, A., Martinez, M. J., Martinez, A. T., Bergbauer, M., & Szewzyk, U. (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology, 64* (8), 2788–2793.

Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Laccase mediator systems. *Applied and environmental microbiology, 66* (2), 524-528.

Koutrotsios, G., & Zervakis, G. I. (2014). Comparative Examination of the Olive Mill Wastewater Biodegradation Process by Various Wood-Rot Macrofungi. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 1-14.

Kumar, S. V., Phale, P. S., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng., 83*, 386-394.

Larsson, S., Cassland, P., & Jönsson, L. J. (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of Laccase. *Applied and environmental microbiology, 67* (3), 1163-1170.

Levin, L., Papinutti, L., & Forchiassin, F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology* (94), 169-176.

Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N. S., Rogalski, J., Jaszek, M., y otros. (1998). Activity of free and immobilized extracelular Cerrena unicolor laccase in water miscible organic solvents. *Holzforschung, 52*, 589-895.

Maestro Durán, R., Borja Padilla, R., Martín Martín, A., Fiestas Ros de Ursinos, J. A., & Alba Mendoza, J. (1991). Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Grasas y Aceites, 42* (4), 271-276.

Mansur, M., Arias, M. E., Copa-Patiño, J. L., Flärdh, M., & González, A. E. (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia, 95* (6), 1013–1020.

Martínez Nieto, L., Ramos Cormenzana, A., Pareja, G. M., & Garrido Hoyos, S. (1992). Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*. *Grasas y Aceites, 43* (2), 75-81.

Martirani, L., Giardina, P., Marzullo, L., & Sannia, G. (1996). Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water research, 30* (8), 1914-1918.

Mathiasen, T. E. (1995). Laccase and beer storage. *PCT International application, WO 9521240 A2*.

Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry, 60*, 551-565.

Milligan, C., & Ghindilis, A. (2002). Laccase based sandwich scheme immunosensor employing mediatorless electrocatalysis. 14. *Electroanalysis*, 415-419.

Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Duran, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol., 13*, 20-216.

Montedoro, G., Bertuccioli, M., & Petruccioli, G. (1975). Effetti dei trattamenti con additivi enzimatici e con detannizzanti alle paste di oliva sottoposte ad estrazione per pressione nica, sui rendimenti in olio, sulla velocità di estrazione e sulle caratteristiche analitichedegli oli, delle acque di vegetaz. *La Rivista Italiana Sostanze Grasse, 52*, 255-265.

Morisot, A., & Tournier, J. P. (1986). Repercussions agronomiques de l'épandage d'effluents et déchets de moulins à huile d'olive. *Agronomie, EDP Sciences, 6* (3), 235-241.

Munari, F. M., A., G. T., Calloni, R., & Dillon, A. J. (2007). Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. *World. J. Microb. Biot., 24*, 1383-1392.

Paredes, M. J., Monteoliva-Sanchez, M., Moreno, E., Perez, J., Ramos-Comenzana, A., & Martinez, J. (1986). Effect of waste waters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil. *Chemosphere, 15* (5), 659-664.

Peláez, F., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*, 36-42.

Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and enviromental microbiology, 65* (9), 3805-3809.

Quarantino, D., D´Annibale, A., Federici, F., Cereti, C. F., Rossini, F., & Fenice, M. (2007). Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on *Zea mays L.* seeds. *Chemosphere, 66* (9), 1627–1633.

Rodríguez, M. M., Pérez, J., Ramos Cormazana, A., & Martínez, J. (1988). Effect of extracts obtained from olive oil mill waste waters on *Bacillus megaterium* ATCC 33085. *Journal of Applied Bacteriology, 64*, 219-226.

Rofman, A., & Vázquez Blanco, J. M. (s.f.). *Aspectos relevantes del rol de la pequeña producción en el circuito productivo del olvio. Diagnóstico y propuestas.* Recuperado el 15/01/2017, de http://www.econ.uba.ar/planfenix/novedades/Area%20III/Aspectos%20relevantes%20del%20rol%20-%20Rofman-Vazquez%20Blanco.pdf

Saparrat, M. C., Martínez, M. J., Cabello, M. N., & Arambarri, A. M. (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev. Iberoam. Micol., 19*, 181-185.

Sasek, V., Novotny, C., & Vampola, P. (1998). Screening for efficient organopollutant fungal degraders by decolorization. *Czech Mycol., 50* (4), 303-311.

Servili, M., De Stefano, G., Piavquadio, P., & Sciancalepore, V. (2000). A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture, 51*, 357-361.

Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., E., R., Ashter, M., Perez-Boada, M., y otros. (2005). Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol., 115*, 333-343.

Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (Lactuca sativa L.). En G. Castillo Morales, & G. Castillo Morales (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas.* (págs. 71-79). IMTA. México.

Torres, E., Bustos-Jaimes, I., & Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl.Catal. B- Environ., 46*, 1-15.

Vicuña, R., González, B., Seelenfreund, D., Rüttimann, C., & Salas, L. (1993). Ability of natural bacterial isolates to metabolize high and low molecular weight lignin-derived molecules. *Journal of Biotechnology, 30*, 9–13.

Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., y otros. (1998). Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J., 334*, 63–70.

Yaropolov, A. I., Skorobogatko, G. V., Vartanov, S. S., & Varfolomeyer, S. D. (1994). Laccase-properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol., 49*, 257-280.

Softwares utilizados en el presente trabajo:

InfoStat versión 2014-Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

Publicaciones resultantes de esta tesis:

Camusso, C., Loto, L., & Rodriguez, M. E. (2014). Decoloración y degradación de compuestos fenólicos del alpechín con hongos de pudrición blanca. Consejo de Investigación Científica y Tecnológica. Secretaría de Ciencia y Tecnología, *IX Jornadas de Ciencia y Tecnología. "Ciencia y Tecnología al Servicio de la Democracia".* Eudelar. La Rioja (capital), Argentina.

Loto, L., Camusso, C., Brito, R., & Milanesio, F. (2015). Decontaminación de efluentes provenientes del procesamiento del aceite de oliva mediante el tratamiento con hongos de pudrición blanca. Subsecretaría de Ciencia y Tecnología de la provincia de La Rioja. Ministerio de Educación, V. Calbo, & M. E. Gonaldi (Edits.), *III Jornadas provinciales de vinculación y transferencia científica y tecnológicas. Resúmenes.* (pág. 23 y 24). Universitas. Editorial Científica Universitaria. La Rioja (capital), Argentina.

Loto, L., Camusso, C., Brito, R., & Milanesio, F. (2015). Decontaminación de efluentes provenientes del procesamiento del aceite de oliva mediante tratamiento con hongos de pudrición blanca. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, *CLICAP 2015. Congreso La3928tinoamericano Ingeniería y Ciencias Aplicadas* (pág. 992). Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael, Mendoza, Argentina.

Anexo I. Normas Autorización Vuelco Industriales. Procedimiento para la autorización de vuelco de efluentes Usuarios No Residenciales. Aguas Riojanas SAPEM.