



**Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de la Plata**

**Biotransformación de los residuos del vino
de la costa de Berisso (provincia de Buenos
Aires) por hongos saprótrofos**

Lic. María Inés Troncozo

Director: Dr. Mario C. N. Saparrat

Director: Dr. Pedro A. Balatti

Tesis para optar el grado académico de
Doctora en Ciencias Naturales

-2018-

Siempre ten presente que la piel se arruga,
el pelo se vuelve blanco,
los días se convierten en años...
Pero lo importante no cambia,
tu fuerza y tu convicción no tienen edad.
Tu espíritu es el plumero de cualquier telaraña.
Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.
Detrás de cada logro, hay otro desafío.
Mientras estés viva, siéntete viva.
Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo.
No vivas de fotos amarillas...
Sigue, aunque todos esperen que abandones.
No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.
Haz que, en vez de lástima, te tengan respeto.
Cuando por los años no puedas correr, trota.
Cuando no puedas trotar, camina.
Cuando no puedas caminar, usa el bastón...
¡Pero nunca te detengas!

Madre Teresa de Calcuta

Dedicado a:

*A mis padres, mis hermanos,
al resto de mi familia y a mi chimu.*

AGRADECIMIENTOS

A mi director Dr. Mario C. N. Saparrat por abrirme las puertas al mundo maravilloso de los hongos, por su confianza y apoyo.

A mi director Pedro A. Balatti por sus innumerables aportes y oportunidades brindadas.

A la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) por financiar mi estudio de posgrado mediante el otorgamiento de la beca y a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, por la formación recibida.

A la “Cooperativa del Vino de la Costa de Berisso” que me facilito la obtención del material necesario para llevar a cabo esta tesis doctoral.

Al Instituto de Fisiología Vegetal por abrirme las puertas y mantenerlas abiertas, facilitándome el instrumental de laboratorio cada vez que lo necesité. A todos los integrantes del instituto por su buena onda y especialmente a los infibecarios (becarios y técnicos) por cada momento compartido y apoyo brindado.

A la Cátedra de Microbiología Agrícola por el espacio brindado para poder continuar mi trabajo doctoral, a mis compañeros de laboratorio y a todo el cuerpo docente de la cátedra; por su compañía y charlas, con las que siempre he podido contar para resolver mis dudas.

Al Instituto Carlos Spegazzini, aquel que me vio dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación y aportó gran parte de los aislamientos fúngicos empleados en esta tesis.

A todos los integrantes del Centro de Investigaciones de Hongos Fitopatógenos y Cátedra de Fitopatología de la Fac. de Cs. Agrarias y Forestales (UNLP).

A la Cátedra de Edafología de la Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) que me permitió y acompañó en la determinación y análisis de parámetros químicos presentados en esta tesis.

A las facultativas que siempre estuvieron a mi lado y se alegraron de cada logro obtenido.

A mi familia y amigos quienes siempre me apoyaron en todo momento.

En fin, a toda persona que aportó su granito de arena y dejó una huella en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO I	8
I.1- LA AGROINDUSTRIA DEL VINO	9
I.1.1- Contexto mundial	9
I.1.2- La sustentabilidad de la industria vinícola: biorefinería.....	12
I.2- EL ORUJO DE UVA Y SU REVALORIZACIÓN	13
I.3- FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES).....	15
I.3.1- Definición y antecedentes.....	15
I.3.2 – Componentes de la FES	16
I.3.3- Los hongos en la FES	19
I.4-OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	23
CAPÍTULO II	24
II.1- INTRODUCCIÓN.....	25
II.2- MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
II.2.1- Obtención y acondicionamiento del orujo de uva.....	28
II.2.2- Determinaciones analíticas.....	29
II.2.3- Análisis microbiológicos.....	32
II.2.4- Bioensayos de fitotoxicidad	32
II.3- RESULTADOS	35
II.4- DISCUSIÓN.....	42
CAPÍTULO III	46
I.1- INTRODUCCIÓN.....	47
III.2- MATERIALES Y MÉTODOS	48
III.2.1- Aislamientos fúngicos y su mantenimiento	48
III.2.2- Tratamiento del orujo de uva con los hongos saprótrofos bajo FES	49
III.2.3-Determinaciones analíticas y actividades enzimáticas	51
III.2.4- Análisis estadístico.....	54
III.3- RESULTADOS.....	54
II.4- DISCUSIÓN.....	78
CAPÍTULO IV	85

IV.1- INTRODUCCIÓN	86
IV.2- MATERIALES Y MÉTODOS	87
IV.2.1- Obtención del orujo de uva y su acondicionamiento.....	87
IV.2.2- Determinaciones analíticas	87
IV.2.3- Bioensayos de fitotoxicidad.....	88
IV.2.4- Análisis estadístico	89
IV.3- RESULTADOS.....	89
IV.4- DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	105
CONCLUSIONES.....	106
PERSPECTIVAS	107
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXO	127

RESUMEN

En la localidad de Berisso (Buenos Aires, Argentina), “La Cooperativa de la Costa” cultiva la vid americana *Vitis labrusca* var. *isabella* L. para la elaboración artesanal del “vino de la costa” de consumo local y popular. Esta actividad origina una gran cantidad de subproductos de naturaleza lignocelulósica, denominados comúnmente orujos de uva; cuyo apilamiento en el sitio constituye un reservorio/fuente potencial de patógenos y vectores de impacto sanitario y ambiental. La obtención de abonos o enmiendas orgánicas a partir de subproductos agroindustriales representa una estrategia prometedora en el marco de la gestión y revalorización de este tipo de residuos. El uso del orujo de *V. labrusca* como abono orgánico está limitado por su pH ácido y la presencia de sustancias fenólicas con actividad antagónica sobre los microorganismos y las plantas. La transformación fúngica del orujo bajo condiciones de fermentación en estado sólido (FES) ha revelado ser una alternativa sustentable para la conversión y detoxificación de residuos agroindustriales utilizando hongos saprótrofos. Esto plantea un interrogante acerca del potencial de varios hongos saprótrofos como agentes de biotransformación del orujo en abono orgánico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de tesis fue revalorizar el orujo de uva de *V. labrusca* var. *isabella* que se genera durante la elaboración del vino regional de la Costa de Berisso por medio de hongos saprótrofos bajo condiciones de FES como alternativa para la gestión del residuo y como estrategia para su implementación como abono orgánico. A partir del análisis físico-químico y biológico del orujo de *V. labrusca* se estimó el contenido de materia orgánica y la carga de diferentes macronutrientes. En base al análisis comparativo de diferentes parámetros, se analizó la habilidad de diferentes hongos saprótrofos para transformar el orujo bajo condiciones de FES, identificando alteraciones físico-químicas del orujo por la actividad metabólica de los hongos estudiados. Entre éstos, *Ulocladium botrytis* LPSC 813 fue capaz de degradar y alcalinizar el orujo sin alterar los niveles de $\text{NH}_4\text{-N}$ del sustrato de partida. El orujo transformado con los hongos resultó ser menos fitotóxico y promover el crecimiento vegetal cuando fue aplicado al suelo. Por lo tanto, el tratamiento del orujo de la “Cooperativa de la Costa” con hongos bajo condiciones de FES constituye una estrategia prometedora para su revalorización como abono orgánico y puede ser de utilidad para la gestión sustentable de este tipo de residuo.

ABSTRACT

In Berisso (Buenos Aires, Argentina), the "Cooperativa de la costa" uses the American grape of *Vitis labrusca* var. *isabella* L. for the craft elaboration of the wine of "la costa" of local and popular consumption. This activity originates a large quantity of lignocellulosic byproducts, commonly called grape pomace (GP); whose stacking at the site constitutes a potential reservoir of pathogens and vectors of sanitary and environmental impact. Obtaining organic fertilizers or amendments from agro-industrial by-products represents a promising strategy in the management and revaluation of this type of waste. The use of GP of *V. labrusca* as an organic fertilizer is limited by its acid pH and the presence of phenolic substances with antagonistic activity on microorganisms and plants. Fungal transformation of the GP under conditions of fermentation in solid state (SSF) has revealed to be a sustainable alternative for the conversion and detoxification of agroindustrial residues using saprotrophic fungi. This raises a question about the potential of several saprotrophic fungi as biotransformation agents of GP in organic manure. Therefore, the objective of this thesis work was to revalorize the GP from *V. labrusca* var. *isabella*, that is generated during the elaboration of the regional "vino de la costa" of Berisso, using saprotrophic fungi under SSF conditions as an alternative for waste management and as a strategy for its implementation as organic fertilizer. Analyzing physical-chemical and biological properties of the GP, the content of organic matter and the load of different macronutrients were estimated. Based on the comparative analysis of different parameters, the ability of different saprotrophic fungi to transform GP under SSF conditions was analyzed, identifying physical-chemical alterations of GP by the metabolic activity of the fungi studied. Among these, *Ulocladium botrytis* LPSC 813 was able to degrade and alkalize the pomace without altering the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ levels detected in the starting substrate. The pomace transformed with the fungi turned out to be less phytotoxic and promote plant growth when applied to the soil. Therefore, the treatment of the pomace of the "Cooperativa de la costa" with fungi under SSF conditions constitutes a promising strategy for its revaluation as organic fertilizer and may be useful for the sustainable management of this type of waste.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN GENERAL



I.1- LA AGROINDUSTRIA DEL VINO

I.1.1- Contexto mundial

La elaboración del vino es una de las actividades agroindustriales más antiguas e importantes del mundo (Mateo & Maicas, 2015; Zabaniotou et al., 2018). De acuerdo al reporte de la Organización Internacional de la Uva y el Vino (International Organization of wine and vine- OIV, 2017), en el 2016 el área a nivel mundial destinada a la producción de la vid ocupó una superficie de 7,5 millones de ha, de las cuales se obtuvo una producción total de 75,8 millones de tn de uvas. Mientras que un porcentaje del 47 % de las uvas cultivadas se destinó a la elaboración del vino, el 36 y 8 % restante se empleó para uvas de mesa o pasas, respectivamente. Países como Alemania, Argentina, Australia, Chile, España, Francia e Italia destinan un 75 % o más de su superficie cultivada con fines vinícolas (Fig. I.1); alcanzando una producción mundial media de 272 millones de hl de vino en el lapso de 2012-2016 (International Organization of wine and vine- OIV, 2017).

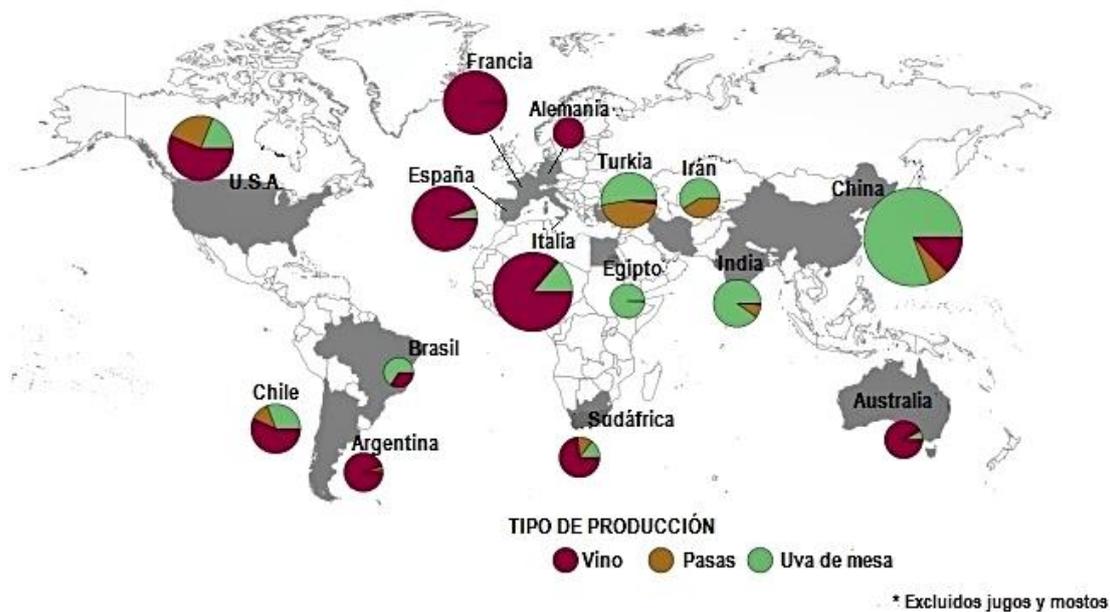


Fig. I.1. Áreas de producción de la vid y tipo de producción (Adaptado de OIV, 2017).

En la preparación de los vinos se emplean diferentes variedades de uva pertenecientes a las especies *Vitis vinifera*, *V. labrusca* y *V. rotundifolia*; siendo considerados los vinos de *V. vinifera* como productos finos de alta calidad (Almanza Merchán, 2012). La Fig. I.2 muestra las etapas del ciclo productivo del vino tinto y blanco, así como, los

diferentes residuos generados en cada etapa del proceso. Después de la cosecha de las uvas, estas son procesadas para la elaboración del vino. Inicialmente, las uvas son removidas del raspón o escobajo; posteriormente estrujadas en una prensa hidráulica, donde la presión generada expulsa el jugo que contiene los azúcares necesarios para la fermentación. Para la preparación de vinos tintos, el jugo extraído es fermentado en conjunto con el orujo de uva; el cual provee los pigmentos (antocianinas) necesarios para crear su color característico. Cuando la fermentación está lista, el mosto (jugo y orujo) es prensado y el jugo es destinado a tambores para la decantación de sedimentos (lodos) y posteriormente almacenado hasta obtener un producto estable para su embotellado. En la elaboración de los vinos blancos, las uvas se prensan antes de la fermentación dado que el color no es un parámetro deseable para este tipo de vino.

Esta actividad genera aproximadamente 13×10^6 t (peso fresco) de residuos sólidos cada año en un breve lapso de tiempo (1-2 meses), equivalente al 20-25 % de las uvas producidas mundialmente; siendo ello dependiente del tipo de materia prima del procesamiento de elaboración (Corbin et al., 2015). Estos residuos se corresponden al raspón o escobajo producto del despallado; el orujo de uva fresco o luego de la fermentación del mosto y los lodos o sedimentos del vino. Esta enorme cantidad de materia sólida generada requiere de soluciones innovadoras para un manejo adecuado y para desarrollar una industria sostenible (Mateo & Maicas, 2015).

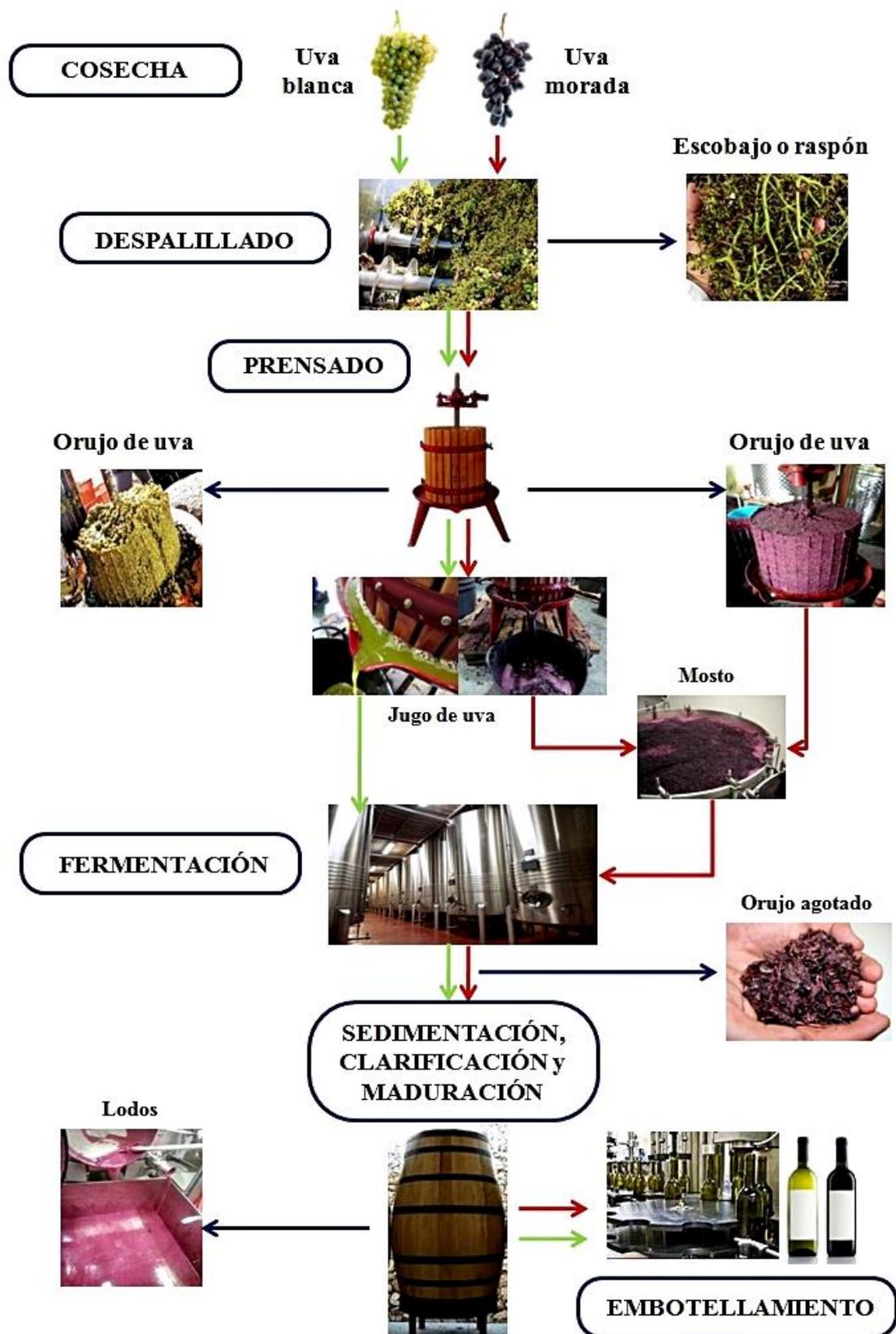


Fig. I.2. Etapas del ciclo productivo del vino (tinto y blanco) y los residuos generados en el proceso.

I.1.2- La sustentabilidad de la industria vinícola: biorefinería

La Organización Internacional de la Uva y el Vino define la vitivinicultura sostenible como “el enfoque global a escala de los sistemas de producción y de transformación de las uvas, asociando a la vez la perennidad económica de las estructuras y los territorios, la obtención de productos de calidad, la consideración de las exigencias de una vitivinicultura de precisión y los riesgos vinculados al medio ambiente, a la seguridad de los productos y la salud de los consumidores, y a la valoración de aspectos patrimoniales, históricos, culturales, ecológicos y paisajísticos” (OIV, 2008). De esta manera la industria del vino se encuentra vinculada a un conjunto de prácticas que sean económicamente viables, ambientalmente seguras y socialmente aceptables, con el objetivo de crear un sistema sostenible. Una de las medidas de gestión que debe adoptar el sector vinícola para alcanzar la sustentabilidad es establecer estrategias que contemplen el aprovechamiento de los residuos generados en las bodegas. Dependiendo de su origen, estos residuos contienen materia de potencial valor que puede derivar en nuevos productos de aplicación; siendo pertinentes considerarlos como subproductos (Zabaniotou et al., 2018).

Recientemente han surgido estudios que proponen una transformación integrada, eficiente y flexible de los subproductos vinícolas para la obtención de un amplio rango de bioproductos mediante procesos físicos, químicos, biológicos o la combinación de los mismos (mixtos). Esta serie de procesos constituye una biorefinería (Dávila et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Lucarini et al., 2018). Tres tipos de biorefinerías se proponen, según el tipo de subproducto usado, los productos a obtener y el proceso de tratamiento empleado (Jin et al., 2018). La biorefinería tipo I es aquella que utiliza normalmente un tipo de subproducto, un proceso y un producto específico. En la tipo II, más de un producto puede ser generado en el proceso usando un determinado subproducto, lo que genera mayor aprovechamiento. La biorefinería tipo 3 no sólo es capaz de producir múltiples productos de valor agregado, sino que además utiliza diferentes tipos de materias primas (subproductos), así como varios métodos de tratamiento.

El modelo de biorefinería considera la existencia de diferentes bloques estratificados en una pirámide, en los cuales los productos se ubican en función de las transformaciones empleadas de acuerdo a modelos agrícolas o económicos circulares de aplicación que determinan su grado de revalorización (Fig. I.3). En la parte inferior de la pirámide se

encuentran los productos empleados en el sector agrícola y energético (fertilizantes, biogás o bioetanol) de menor valor, mientras que en la parte superior se localizan productos de alto valor asociados al sector farmacéutico, de la química fina o de la industria de los alimentos (antioxidantes, colorantes, sustancias útiles para la síntesis de vacunas, antibióticos y proteínas de inmunoterapia, entre otros) (Lucarini et al., 2018). No obstante, la elección de la materia prima a utilizar, el tipo de tratamiento y los productos a obtener están condicionados por el contexto socio-económico y territorial de ámbito regional en el cual se encuentra la bodega (Nizami et al., 2017; Lucarini et al., 2018).

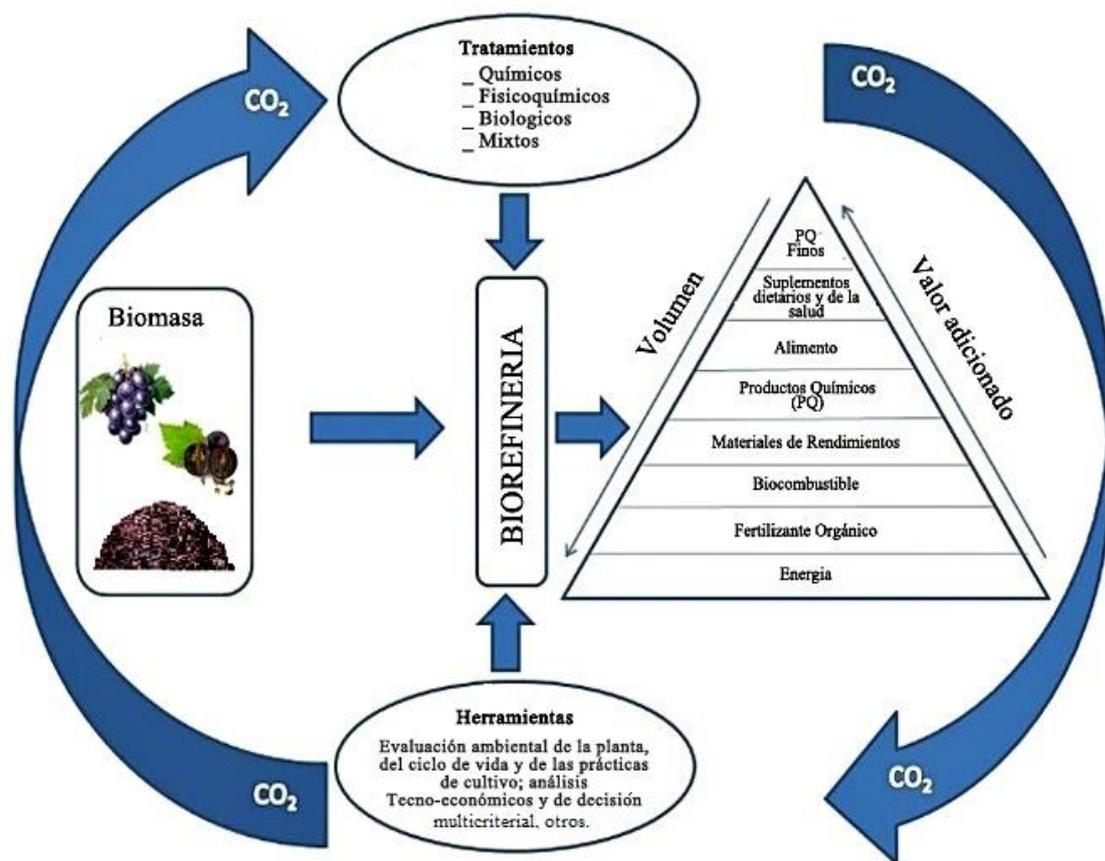


Fig. I.3- Revalorización de los residuos de la agroindustria vinícola desde el concepto de biorefinería (Adaptado de Lucarini et al., 2018)

I.2- EL ORUJO DE UVA Y SU REVALORIZACIÓN

El orujo de uva es el subproducto más abundante generado durante la fabricación del vino, se estima que alrededor de 15-25 kg son obtenidos después del prensado de 100 kg de las uvas (Martínez-Cordeiro et al., 2013; Dávila et al., 2017). Este rendimiento

representa de 10,5 a 13,1 Mtn de orujo de uva producidos en el mundo anualmente (Dávila et al., 2017). Del volumen total generado, un 60 % corresponde al hollejo y el material remanente de la pulpa después de la extracción del jugo de la uva; mientras que el 40 % restante se haya constituido por las semillas (Domínguez et al., 2017). Estos constituyentes son la base para la reutilización del orujo en una amplia gama de productos de diferente valor agregado. La tabla I.1 presenta un listado de los productos derivados del tratamiento del orujo. La mayoría de estos productos se obtienen de forma aislada, como el biogás y los polifenoles mediante digestión anaeróbica y extracción fluida supercrítica, respectivamente; los cuales se podrían aplicar al concepto de biorefinería tipo I (Ghafoor et al., 2012; Fabbri et al., 2015). No obstante, con la creciente demanda de conducir al sector vinícola a prácticas más sustentables, estrategias de revalorización utilizando procesos de biorefinería tipo III han sido planteadas también para el orujo (Fig. I.4) (Dávila et al., 2017; Zabaniotou et al., 2018).

Tabla I.1- Productos obtenidos a partir del orujo de uva.

Producto	Referencias
Harina	Rosales Soto et al., 2012; Argade et al., 2017
Vinagre	Budak & Guzel-Seydim, 2010; Baldas & Altuner, 2018
Aceite	Göktürk Baydar et al., 2007; Garavaglia et al., 2016; Shinagawa et al., 2018
Compuestos fenólicos* y otros antioxidantes	Rockenbach et al., 2011; Ghafoor et al., 2012; Martinez et al., 2016; Allison & Simmons, 2018
Biogás	Fabbri et al., 2015; Da Ros et al., 2016; El Achkar et al., 2016; Martinez et al., 2016; Allison & Simmons, 2018
Bioetanol	Fernández et al., 2010; Rodríguez et al., 2010; Zheng et al., 2012; Corbin et al., 2015
Enzimas fúngicas	Moldes et al., 2003; Botella et al., 2007; Vallejo et al., 2012
Suplemento para ganado	Sánchez et al., 2002; Guerra-Rivas et al., 2017
Fertilizante orgánico	Nogales et al., 2005; Bustamante et al., 2009; Domínguez et al., 2014
Carrier de microorganismos	Bai et al., 2008
Material adsorbente	Avantaggiato et al., 2014; Nayak et al., 2016; Oliveira et al., 2018

* Incluye: antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros.

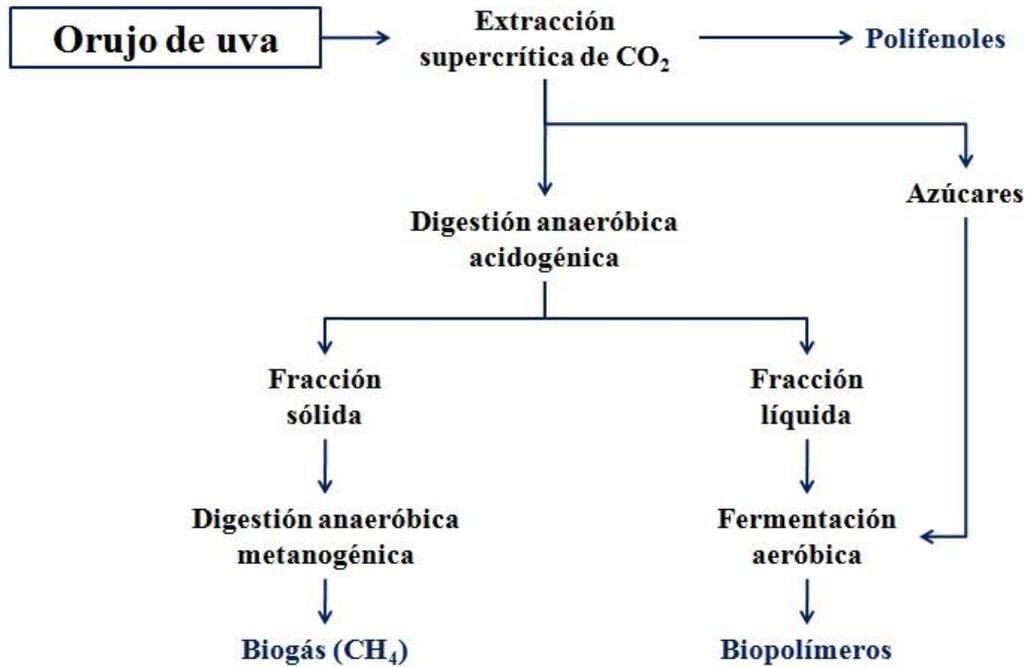


Fig. I.4- Diagrama conceptual de una biorefinería en cascada para la revalorización del orujo de uva (Adaptado de Dávila et al, 2017)

I.3- FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES)

I.3.1- Definición y antecedentes

La FES es un proceso de transformación aeróbica que involucra un soporte sólido húmedo, en ausencia de agua libre y los microorganismos responsables del proceso (Hölker et al., 2004). En la tabla I.2 se enumeran cronológicamente algunas aplicaciones de la FES y sus logros. Esta técnica ha sido tradicionalmente utilizada en países del Sudeste asiático y África para la obtención de alimentos como el pan y el koji, poco explorada en países occidentales (Pandey, 1992). Recién con la utilización de residuos agroindustriales como sustrato para la obtención de proteínas enriquecidas como alimento de ganado, su empleo se potenció como consecuencia a la revalorización de residuos de bajo coste. En las últimas décadas, la FES se ha tornado una estrategia preferida para la obtención de un amplio espectro de productos, en respuesta a presentar una tecnología rentable que le otorga una mayor ventaja competitiva sobre diversos procesos biotecnológicos (Manan & Webb, 2017).

Tabla I.2- Antecedentes de la fermentación en estado sólido (Adaptado de Manan & Webb, 2017).

Tiempo	Logros obtenidos
2000 A.C.	Producción de pan por los egipcios. Producción de queso utilizando <i>Penicillium roqueforti</i> .
1000 A.C.	Producción de Koji (alimento)
550 A.C.	Obtención de ácido kójico
Siglo XVI	Té fermentado
Siglo XVIII	Obtención de vinagre a partir de orujo. Producción de ácido gálico utilizado en cosmética y procesos de impresión.
1860-1900	Tratamiento de aguas residuales. Producción de enzimas fúngicas (principalmente amilasas).
1900-1920	Producción de otras enzimas fúngicas, ácido glucónico y ácido cítrico.
1920-1940	Desarrollo de fermentador tipo tambor.
1940-1950	Producción de penicilina. Desarrollo de la industria de la fermentación.
1950-1960	Transformación de esteroides por cultivos de hongos.
1960-1980	Producción de micotoxinas, enriquecimiento de alimentos con proteínas.
1980– 2000	Desarrollo de aspectos fundamentales de FES, bioprocesos y desarrollos de productos. Bioprocesos: biorremediación, biodegradación de materiales peligrosos, desintoxicación biológica de residuos agroindustriales, biotransformación de cultivos y residuos de cultivos para enriquecimiento nutricional, biopulpeo, entre otros. Productos: - Compuestos bioactivos (aflatoxina, penicilina, ácido gibereleico, tetraciclina, volátiles antifúngicos, etc.) - Enzimas (lacasa, xilanasa, endoglucanasas, etc.) - Ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico, ácido gálico, ácido oxálico, ácido fumárico) - Otros productos (pigmentos, etanol, biosurfactantes, etc.)
2000- presente	La FES como un proceso de biorefinería.

I.3.2 – Componentes de la FES

En toda FES son necesarios dos componentes básicos: el soporte y los microorganismos. Existe una gran variedad de materiales que pueden emplearse como soporte, los cuales pueden clasificarse en dos grupos, sintéticos y naturales (Nigam & Singh, 1994). Los sintéticos actúan únicamente como soporte físico siendo requerido su impregnación con un medio nutritivo para cubrir las demandas de los microorganismos

involucrados. En cambio, los soportes naturales son sitio de anclaje y fuente de carbono y energía para los microorganismos, por lo cual se considera que un término adecuado para este tipo de soporte es el de sustrato (Pandey, 1992). Los residuos generados en las actividades agrícolas, forestales y agroindustriales son los sustratos más buscados para la aplicación de la FES, debido a su gran disponibilidad (grandes volúmenes de material), bajo costo e impacto negativo sobre el ambiente, entre otros (Sánchez, 2009; Sadh et al., 2018). Los principales componentes de los residuos lignocelulósicos son la celulosa, hemicelulosa y lignina; sin embargo, la abundancia y proporción de estos compuestos varía en relación a su origen vegetal (Sánchez, 2009). La celulosa es un homopolisacárido de moléculas de β -D-glucopiranososa (glucosa) unidas por enlaces glucosídicos. Estas cadenas se pueden agregar formando fibrillas, mientras que algunas adoptan una conformación organizada (celulosa cristalina) otras forman una trama desorganizada (celulosa amorfa) la cual es más susceptible al ataque microbiano (Klemm et al., 2005; Sánchez, 2009) (Fig I.5).

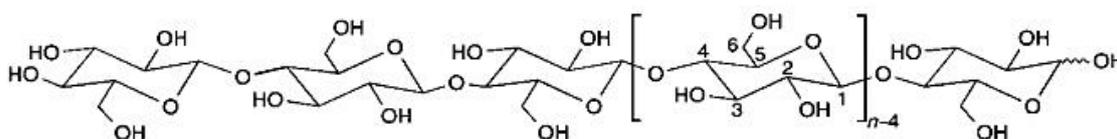


Fig I.5- Representación de la estructura molecular de la celulosa (Klemm et al, 2005)

La hemicelulosa es un heteropolisacárido de menor peso molecular que la celulosa, formado a partir de un amplio espectro de azúcares: D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido 4-O-metil-glucarónico y ácido D-glucarónico. Los azúcares están unidos entre sí por los enlaces β -1,4 y a veces, por los β -1,3 glucosídicos. Su estructura presenta ramificaciones que se integran fácilmente con la celulosa, dando estabilidad y flexibilidad a la matriz (Sánchez, 2009; Santos et al., 2012) (Fig I.6).

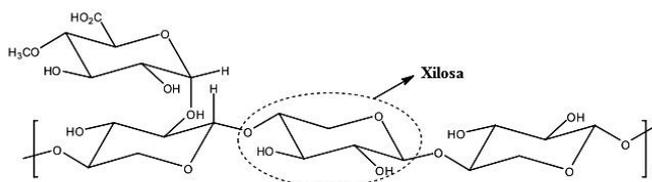


Fig I.6- Representación de la estructura molecular de un tipo de hemicelulosa, xilano (Santos et al., 2012).

La lignina es un heteropolímero amorfo con una estructura tridimensional compuesta por 3 unidades fenilpropílicas: p-hidroxifenil (H), guayacil (G) y siringil (S); derivadas de sus respectivos alcoholes (cumarílico, coniferílico y sinápico) (Fig I.7) (Higuchi, 1990). La proporción (H:G:S) varía entre los diferentes grupos de plantas vasculares e incluso entre las diferentes capas de la pared celular vegetal; formando en la pared secundaria una matriz amorfa junto con la hemicelulosa que protege a las fibras de celulosa. A causa de su estructura química, la lignina resulta altamente resistente a la degradación biológica; determinado que la lignólisis sea un proceso lento (Martínez et al., 2005; Bilal et al., 2017).

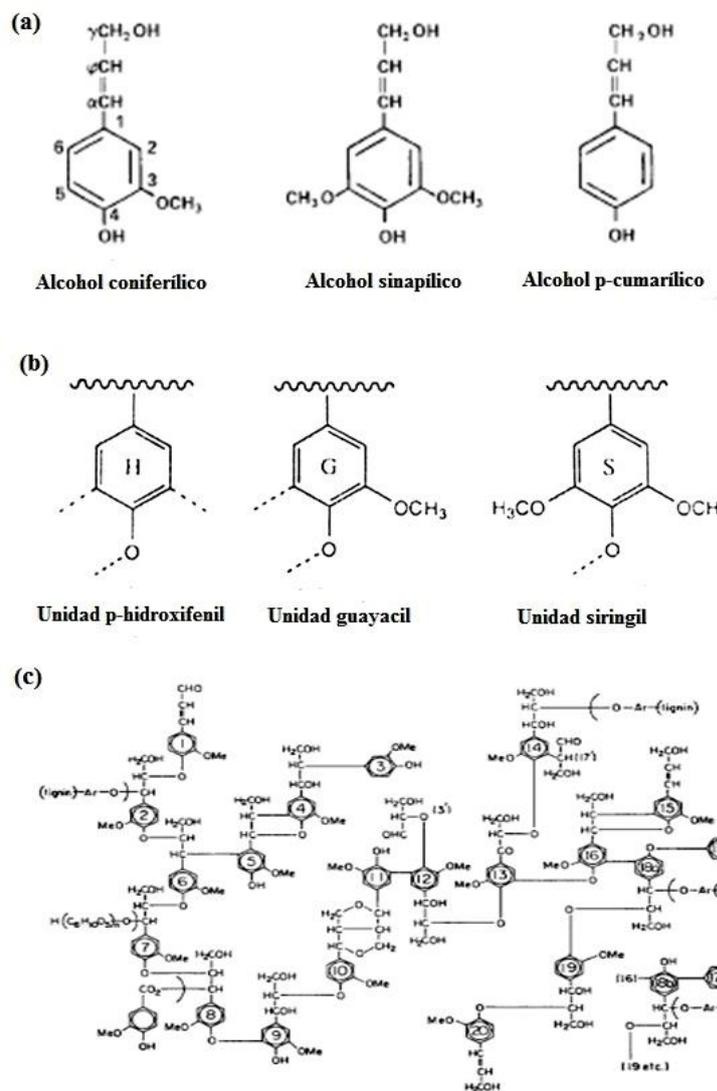


Fig. I.7- Estructura química de la lignina: (a) precursores involucrados en la síntesis, (b) unidades fenilpropílicas del polímero y (c) una estructura modelo que ejemplifica los diferentes tipos de uniones entre las unidades (Adaptado y modificado de Higuchi (1990)).

En relación al componente biológico, la FES puede incluir 2 tipos principales: la microflora natural (indígena) o microorganismos inoculados (Pandey, 1992). En sistemas inoculados, el sustrato debe ser previamente esterilizado a fin de asegurar la formación de un producto deseado, generado a partir de la transformación de la matriz sólida de partida por el microorganismo incorporado. Por lo tanto, la elección del tipo de microorganismo a inocular es crucial para el éxito del mismo.

I.3.3- Los hongos en la FES

El 80 % de los microorganismos utilizados en la FES corresponde a los hongos (Reino Fungi), debido a su versatilidad metabólica (Pandey, 1992; Soccol et al., 2017). Los hongos son organismos unicelulares o filamentosos eucarióticos con pared celular de quitina; heterótrofos por absorción y con reproducción asexual o sexual mediante la formación de esporas (Alexopoulos, 1962). Los hongos filamentosos tienen un cuerpo vegetativo representado por hifas, que se ramifican y se organizan formando el micelio. El crecimiento del micelio facilita la penetración, la liberación de enzimas extracelulares y la adquisición de nutrientes disponibles en los sustratos sólidos; característica que determina su mayor habilidad para colonizar y transformar los mismos comparado a las levaduras (Soccol et al., 2017). El crecimiento de los hongos filamentosos sobre el sustrato sólido permite diferenciar tres tipos de capas miceliarias estrechamente relacionadas con la disponibilidad de oxígeno: un micelio aéreo (capa 1), un micelio hidratado (capa 2, caracterizada por estar asociado en el sustrato a poros llenos de agua) y un micelio inmerso (capa 3) (Fig I.8). La velocidad de colonización de las hifas en el sustrato puede ser rápida cuando las condiciones del medio son aeróbicas; la disponibilidad de oxígeno permite que la capa 1 se haga tan densa que comienza a formar la capa 2 y debido a que el hongo sigue creciendo, el espesor de la capa 2 aumenta tanto hasta que su parte inferior impide el acceso del oxígeno a la matriz sólida del sustrato. En condiciones anaeróbicas, el micelio, que constituye las capas 2 y 3, reduce su velocidad de crecimiento e incluso puede comenzar a fermentar (Rahardjo et al., 2006).

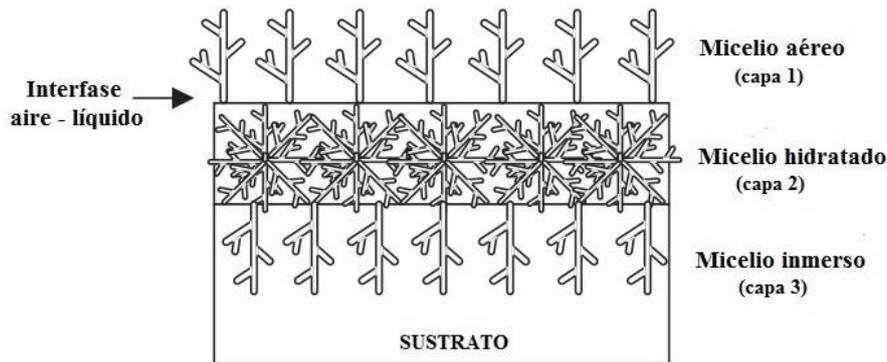


Fig. I.8- Representación de las capas de micelio sobre un sustrato sólido (Adaptado de Rahardjo et al., 2006)

Los hongos creciendo sobre sustratos sólidos pueden distinguirse en diferentes grupos ecofisiológicos; en función al modo de nutrición y hábitat (Dix & Webster, 1995). De acuerdo con esta clasificación podemos distinguir hongos saprótrofos: a) de la madera, b) de la hojarasca y c) del suelo.

a) Hongos saprótrofos de la madera

Estos hongos xilófagos son capaces de desintegrar las paredes de la célula y, por lo tanto, cambiar las características físicas y químicas de la madera; dando lugar a una desorganización tal de la materia denominado pudrición. De acuerdo a la naturaleza de su desarrollo en la madera y al tipo de deterioro que ocasionan los hongos de pudrición pueden clasificarse en tres grupos: blanca, castaña o blanda (Martínez et al., 2005). Los primeros son los únicos capaces de degradar los 3 polímeros principales que componen la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina), generando una apariencia blanquecina característica sobre la misma. Entre los hongos de pudrición blanca (HPB) se pueden distinguir 2 de patrones de degradación, no mutuamente excluyentes: simultánea (no selectiva) y selectiva (Martínez et al., 2005; Riley et al., 2014). Mientras que en el primer caso los 3 polímeros son degradados a una velocidad similar; en el segundo se observa una degradación preferencial de la hemicelulosa y la lignina sobre la celulosa. Los hongos que causan este tipo de pudrición pertenecen exclusivamente al Phylum Basidiomycota; grupo altamente estudiados en cultivos de FES, dentro de los cuales se ha destacado la participación de aislamientos pertenecientes a *Phanerochaete chrysosporium*, *Corioloropsis rigida*, *Bjerkandera adusta*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus eryngii* y *P. ostreatus* (Gómez et al., 2005; Huang et al., 2010; Salvachúa et

al., 2011; López-Abelairas et al., 2013). Los hongos de pudrición castaña (HPC) se distinguen por exhibir una preferencia por los polisacáridos de la pared celular, remueven selectivamente la celulosa y hemicelulosa modificando mínimamente la lignina mediante reacciones de fenton (Arantes et al., 2012). Esto da como resultado una gran acumulación de lignina, que otorga un color pardo a la madera atacada por el hongo al que debe su nombre. Estos hongos representan menos del 10 % de los Basidiomycetes involucrados en la pudrición de la madera, cumpliendo un rol fundamental en la descomposición de los bosques de coníferas y en la contribución a la formación del humus del suelo (Martínez et al., 2005). Entre ellos se pueden mencionar a *Gloeophyllum trabeum* y *Postia placenta*; reportándose su empleo en la generación de bioetanol de segunda generación bajo condiciones de FES (Rasmussen et al., 2010; Salvachúa et al., 2011). Por último, los hongos de pudrición blanda atacan las paredes secundarias de las células vegetales dando lugar a cavidades cilíndricas, a través de las cuales aprovechan principalmente los polisacáridos fácilmente removibles lo que provoca un reblandecimiento de los tejidos de la madera (Martínez et al., 2005). Estos hongos actúan preferentemente en maderas con un alto grado de humedad y bajo contenido de lignina, como *Chaetomium globosum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* (Levy, 1966; Sánchez, 2009; Hamed, 2013).

b) Hongos saprótrofos de la hojarasca

Los hongos saprótrofos que participan en la descomposición de la hojarasca pueden ser divididos según las etapas sucesionales del proceso de transformación del mantillo forestal: tempranos, intermedios y tardíos (Voriskova & Baldrian, 2013; Bani et al., 2018). En la primera etapa, se destacan aquellos que consumen compuestos solubles fácilmente degradables, como almidón, aminoácidos y azúcares; siendo reemplazados por aquellos capaces de atacar la celulosa. En el último grupo, se encuentran aquellos que tienen la capacidad de degradar la lignina, donde la tasa de descomposición decae drásticamente en comparación con la primera etapa. En la etapa inicial, los hongos del Phyla Ascomycota y Mucoromycota son los más frecuentes; siendo reemplazados subsecuentemente por representantes del Phylum Basidiomycota, dominando la etapa tardía (Osono, 2007). Entre los hongos de la hojarasca se pueden mencionar a *Ciliochorella buxifoliae*, *Ulocladium botrytis* y a miembros de los géneros *Clitocybe*, *Collybia*, *Marasmius* y *Mycena*; entre otros (Osono, 2007; Saparrat et al., 2008b; Troncozo et al., 2015).

c) Hongos saprófitos del suelo

Los hongos del suelo son ubicuos debido a su gran versatilidad metabólica y sus estrategias de competencia y supervivencia, como la producción de esporas en condiciones ambientales adversas (Gams, 1992). Ellos juegan un rol crucial en la fertilidad de los suelos, actuando como amonificadores, transformadores de nitrógeno, descomponedores de celulosa y como agentes participantes en la síntesis de ácidos húmicos (Waskman, 1916). Entre ellos se encuentra *Trichoderma harzianum*, un hongo ampliamente estudiado debido a su interés como promotor del crecimiento vegetal y agente de control biológico de hongos fitopatógenos; así como también, la producción de hidrolasas bajo condiciones de FES (Altomare et al., 1999; Delabona et al., 2012).

I.4-OBJETIVOS E HIPÓTESIS

I.4.1-Objetivo general

Revalorizar el orujo de uva de *Vitis labrusca* var. isabella que se genera durante la elaboración del vino regional de la Costa de Berisso por medio de hongos saprótrofos bajo condiciones de fermentación en estado sólido, como alternativa para la gestión del residuo y como estrategia para su implementación como abono orgánico.

1.4.2- Objetivos específicos

1. Caracterizar el orujo de uva a nivel físico-químico y biológico (Capítulo II).
2. Usar hongos saprótrofos para transformar el orujo de uva en condiciones de fermentación en estado sólido (Capítulo III).
3. Indagar los mecanismos involucrados en la transformación fúngica del orujo (Capítulo III).
4. Caracterizar el orujo transformado por los hongos saprótrofos y evaluar su potencial como abono orgánico (Capítulo IV).

1.4.3- Hipótesis

1. El residuo vitivinícola es recalcitrante a la degradación debido al bajo pH y elevado contenido fenólico.
2. El orujo inhibe la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas.
3. Los hongos saprótrofos utilizan el orujo como sustrato de crecimiento y lo modifican o transforman mediante diferentes estrategias metabólicas.
4. El orujo transformado por los hongos es un producto con propiedades físico-químicas y biológicas compatibles con las de un abono orgánico.

CAPÍTULO II
EL ORUJO DE UVA DE
***VITIS LABRUSCA*:**
CARACTERIZACIÓN
FISICO-QUÍMICA Y
BIOLÓGICA



II.1- INTRODUCCIÓN

En la zona del monte costero de la provincia de Buenos Aires (Argentina) se cultiva la uva americana *Vitis labrusca* var. isabella bajo el sistema de parral; el destino principal de las uvas es la producción de un vino de carácter regional, con aroma frutado y sabor característico (Sisterna et al., 2010; Otero, 2013) (Fig. II.1). En la actualidad, la superficie total de cultivo es de alrededor de 21 hectáreas distribuidas en los partidos de Avellaneda y Berisso (Fig. II.2), las cuales se encuentran a cargo de pequeños productores familiares nucleados que conforman la Cooperativa de la Costa (Resolución C.23/201, 2013). La sede de la cooperativa se encuentra emplazada en el partido de Berisso el cual abarca el 94 % del área de cultivo; reportando una producción de 350 hectolitros de vino en el 2011 (Otero, 2013). La elaboración del vino regional origina anualmente una gran cantidad de subproductos sólidos de naturaleza lignocelulósica, siendo el más abundante el orujo de uva. Este subproducto, junto con otros, es apilado y descartado en el sitio generando un reservorio potencial de patógenos y vectores de impacto sanitario y ambiental. La Fig. II.3 muestra la bodega de la Cooperativa de la Costa de Berisso, parte de su mobiliario, el orujo de uva y el sitio de destino final del mismo. La ausencia de medidas de gestión y revalorización de los subproductos generados en la bodega, aleja a la cooperativa del principio de sustentabilidad propuesto por la Organización Internacional de la uva y del vino (OIV, 2008).



Fig. II.1- *Vitis labrusca* var. isabella: a) cultivo bajo sistema parral y b) destino principal de su producción (vino).

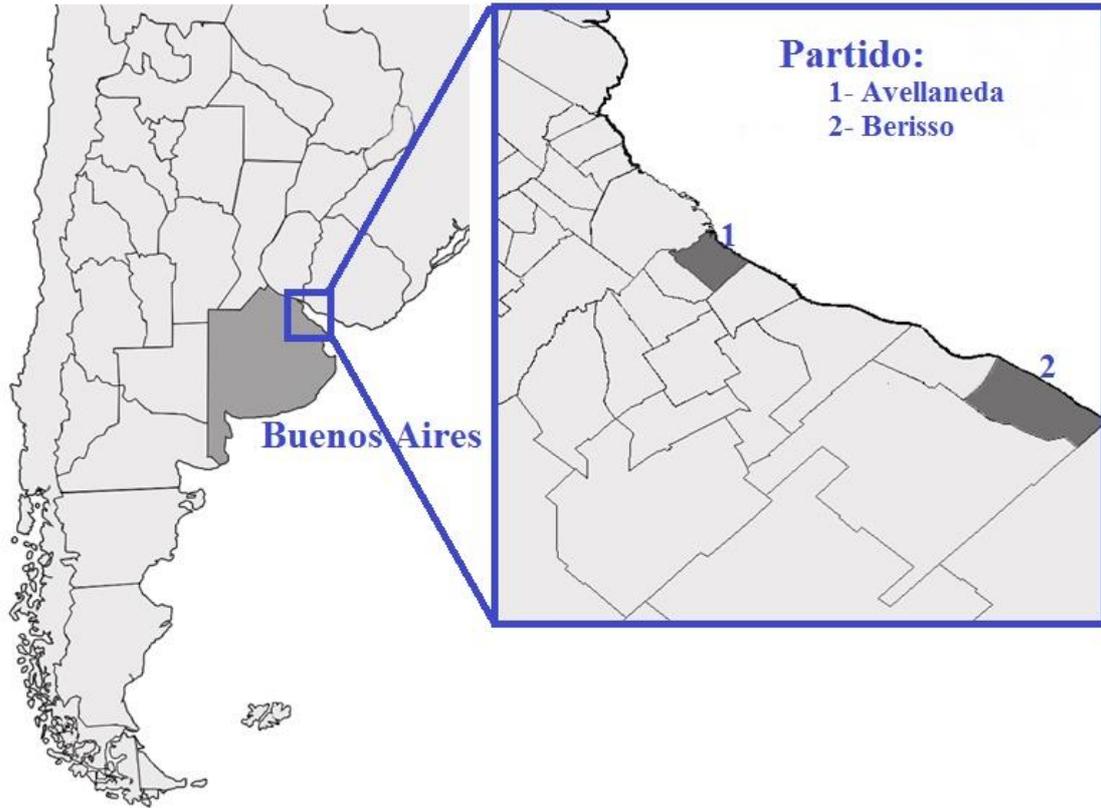


Fig. II.2- Áreas de producción de la vid *V. labrusca* var. isabella en Buenos Aires (Argentina).

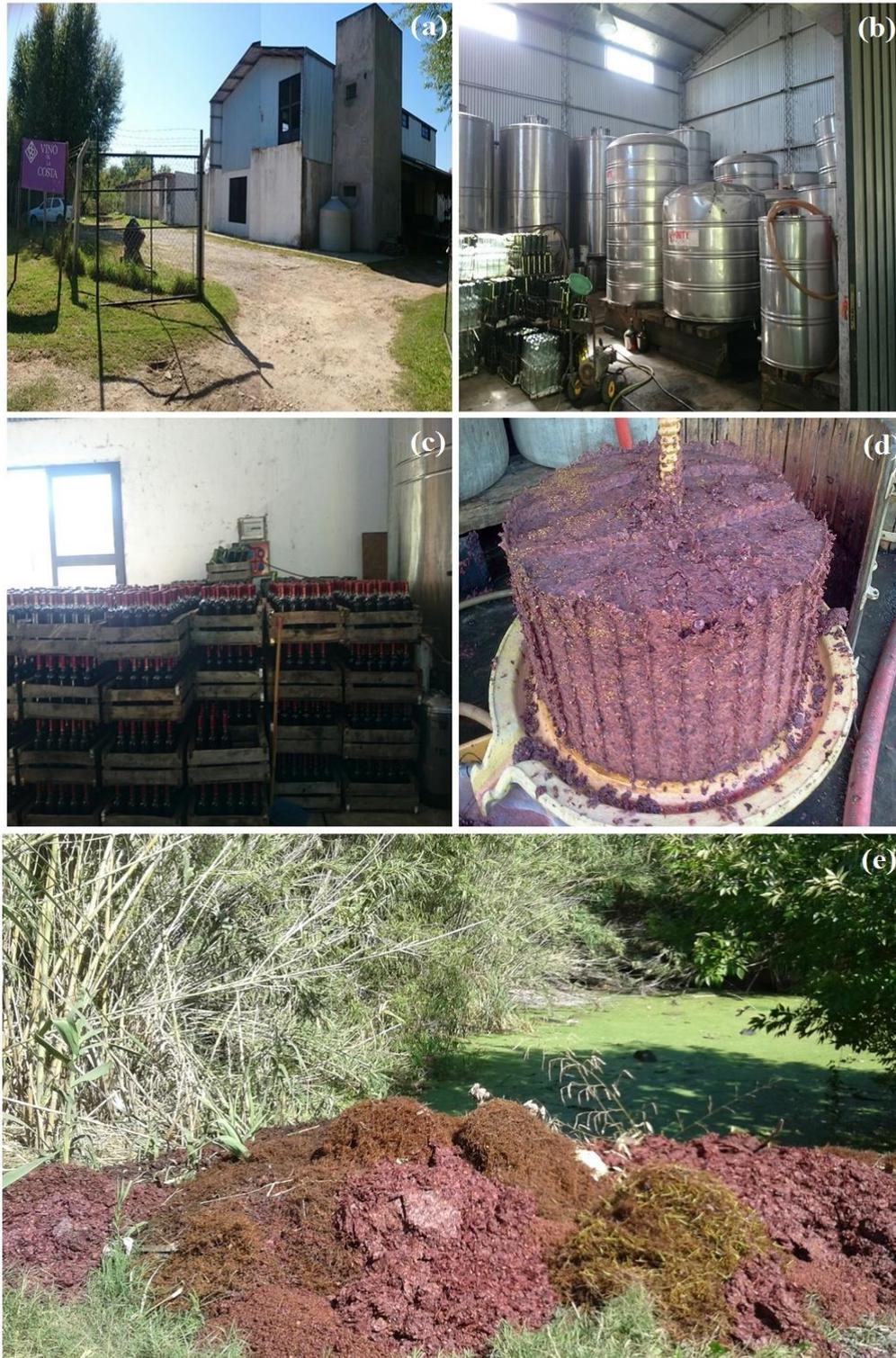


Fig. II.3- Cooperativa de la Costa de Berisso: a) bodega, b) tanques fermentadores del vino, c) sitio de almacenamiento de las botellas de vino d) orujo de uva y e) sitio destino del orujo de uva y otros subproductos lignocelulósicos.

Una de las posibilidades para la gestión y revalorización del orujo de *V. labrusca* es su empleo como enmienda o abono orgánico. La diferencia entre estos dos tipos de productos radica que mientras una enmienda mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos; un abono o fertilizante además proporciona nutrientes esenciales a las plantas (Mazzarino & Satti, 2012). Los orujos de uva de *V. vinífera* se han empleado como abonos orgánicos, destacando entre sus características un alto contenido de materia orgánica y macronutrientes, especialmente el K (Ferrer et al., 2001; Bustamante et al., 2009). Otros reportes indican que este subproducto provoca un efecto inmovilizador del nitrógeno después de su aplicación al suelo, el cual podría estar relacionado tanto por la presencia de compuestos inhibitorios como por la competencia de los microorganismos por este nutriente esencial (Tiquia et al., 1996; Flavel et al., 2005). Resultados preliminares obtenidos por el grupo de trabajo, revelaron que la aplicación de dosis de 2,5; 5; 10 y 15 t/ha de orujo de uva de *V. labrusca* al suelo no produce ningún efecto sobre el crecimiento de plantas de lechuga y tomate cultivadas en macetas (datos no mostrados). En adición a esto, los orujos de uva presentan una composición química variable, influenciada por factores como el clima, el tipo de suelo, el manejo del cultivo, la variedad de vid cultivada y la fecha de muestreo (Eraso et al., 1991; Bustamante et al., 2009; Rondeau et al., 2013; Arcanjo et al., 2017).

La ausencia de información sobre la constitución agroquímica del orujo de uva derivado de la producción de la Cooperativa del Vino de la Costa, así como, dosis recomendadas para su empleo adecuado como abono orgánico hacen necesario el monitoreo de los mismos. Por lo cual, el objetivo de este estudio fue caracterizar el orujo de uva de *V. labrusca* var. isabella a nivel físico-químico y biológico. El conocimiento de estos parámetros contribuirá con información para establecer el potencial de éste como abono orgánico.

II.2- MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1- Obtención y acondicionamiento del orujo de uva

El orujo de uva se obtuvo de la “Cooperativa de La Costa” ubicada en la calle Bagliardi y Tres de Abril, Berisso, Buenos Aires (latitud 34°53'22.79"S; longitud 57°49'21.11"O) durante 3 campañas sucesivas de muestreo realizadas en el periodo 2015-2017. Para cada campaña se colectaron 10 muestras de orujo al azar, las cuales fueron posteriormente unificadas en una muestra compuesta. En el laboratorio, una alícuota de

esta muestra se mantuvo en frío (4 °C) durante un periodo como máximo de 15 días, para realizar el análisis microbiológico y la determinación del contenido de humedad. El resto del material se secó en estufa a 60 °C hasta peso constante y se fraccionó en bolsas de papel debidamente identificadas y posteriormente almacenadas en contenedores herméticamente cerrados hasta la realización de estudios posteriores.

II.2.2- Determinaciones analíticas

Se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos en cada muestra compuesta obtenida de cada campaña de muestreo, con 2 réplicas técnicas que fueron promediadas para obtener un único valor. A partir de los 3 datos se calculó la media, el rango y el coeficiente de variación para cada parámetro.

II.2.2.1-Humedad

Se tomó una muestra fresca (5 g) y se determinó su peso fresco y su peso después de secar la muestra en estufa a 60 °C hasta peso constante. El porcentaje de humedad se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{EC. II.1 Humedad (\%)} = ((\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}) * 100$$

II.2.2.2-Materia orgánica (MO) y ceniza

El contenido porcentual de materia orgánica y cenizas se determinó calcinando una muestra de 5 g de materia seca (5g) en mufla a 550 °C (PROMAR, 1991).

II.2.2.3-Carbono orgánico total (COT)

El contenido porcentual de COT se determinó siguiendo el método de Walkley & Black (IRAM-SAGPyA 29571-2, 2011). Para ello, una alícuota de 0,2 g de muestra seca se sometió a un tratamiento con 5 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N y 10 ml de H_2SO_4 . La mezcla resultante se mantuvo en reposo durante 30 min a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo se llevó a un volumen final de 15 ml con agua destilada. Posteriormente, se transfirieron 10 ml de la solución a un erlenmeyer al cual se le adicionó 1ml de H_3PO_4 , unas gotas de difenilamina (indicador) y se valoró el exceso de dicromato utilizando una solución de sal de Mohr.

II.2.2.4-Nitrógeno total (NT)

El contenido porcentual de NT fue determinado por el procedimiento micro-Kjeldahl (PROMAR, 1991). Se fraccionó 0,1 g de muestra seca en un tubo a la que se le adicionó

0,3 ml de agua destilada, 0,2 g de mezcla catalítica y 0,5 ml de H₂SO₄ concentrado (98 %). Se colocó el tubo en un digestor a 100 °C durante 3 min, hasta que la mezcla resultante adquiere color verde pálido (indicativo de la total conversión del nitrógeno orgánico a NH₄SO₃). Posteriormente, toda la mezcla de reacción se llevó a volumen con agua destilada y una alícuota se destiló por vapor de arrastre sobre H₃BO₃, para finalmente valorarse con 0,1 N de H₂SO₄.

II.2.2.5-Fósforo total (PT)

El contenido de PT se determinó siguiendo el método de amarillo vanadato-molibdato (Chapman & Pratt, 1973), usando como estándar una solución de KH₂PO₄ (50 ppm). Para ello, a partir de una alícuota de ceniza (0,2 g) derivada de una muestra seca de orujo se llevó a cabo una digestión con HNO₃ 0,2 N a temperatura ambiente, llevando la mezcla resultante a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Posteriormente, utilizando una alícuota de esta solución se llevó a cabo una reacción con molibdato de amonio-vanadato de amonio durante 30 min a temperatura ambiente. Al final de la reacción, se midió la absorbancia de la mezcla a 470 nm usando un espectrofotómetro Metrolab (225 BD UV vis). El contenido de FT fue expresado como g/kg de peso seco de orujo de uva.

II.2.2.6-Capacidad de intercambio catiónico (CIC), bases de intercambio (Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺) y saturación de bases

La CIC y el contenido de Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺ se determinó siguiendo el método de saturación con NH₄OAc (SAGyP/AACS, 2004). Para ello, una muestra seca de orujo de uva (2 g) se sometió a un tratamiento con 10 ml de NH₄OAc 1 N a pH 7 por tres veces consecutivas. La mezcla resultante se agitó durante 5 min y se filtró empleando un papel de filtro (Whatman n° 40, 125 mm), el sobrenadante (S1) se recogió en un matraz erlenmeyer de 50 ml. La muestra de orujo con exceso de amonio retenida en el papel de filtro se lavó tres veces con 10 ml de alcohol etílico. Posteriormente, la muestra lavada se trató con 10 ml de NaCl acidulado al 10 % por tres veces consecutivas. La mezcla resultante se agitó durante 5 min y se filtró recogiendo el sobrenadante (S2) en un matraz erlenmeyer de 50 ml. El contenido de Na⁺ y K⁺ presentes en el S1 se midió usando un fotómetro de llama (ZF 250 Zeltec ®), y el contenido de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ mediante complejometría con EDTA 0,02 N. Para medir la CIC, una alícuota del S2 se destiló mediante vapor de arrastre sobre H₃BO₃ y se valoró con 0,02 N de H₂SO₄. Los datos obtenidos fueron expresados como cmol_c/kg de orujo de uva seco. El

porcentaje de saturación de bases (S) se calculó a partir de los datos obtenidos usando la siguiente ecuación:

$$\text{EC. II.2} \quad S (\%) = (\Sigma \text{Cationes} / \text{CIC}) * 100$$

II.2.2.7-Obtención de la pasta de orujo (PS) y su extracto de saturación (EPS)

A una alícuota de 12 g de orujo seco se le adicionó agua destilada y se obtuvo una PS (1:2,5), caracterizada con un brillo metálico en ausencia de agua libre. Trascorridas 24 h de reposo a temperatura ambiente, la pasta se filtró utilizando un embudo Büchner con papel de filtro Whatman n° 40 y se colectó la fase acuosa (EPS) que se conservó a 4 °C.

II.2.2.8-Sodio (Na), Potasio (K); Calcio (Ca) y Magnesio (Mg)

Se determinó el contenido de Na y K presentes en el EPS correspondientes a las muestras de orujo usando un fotómetro de llama (ZF 250 Zeltec ®); el contenido de Ca y Mg mediante complejometría con EDTA 0,02 N (SAGyP/AACS, 2004). Los datos obtenidos fueron expresados como g/Kg de orujo seco, excepto para el Na que fue expresado como mg/Kg de orujo seco.

II.2.2.9-pH actual (pH_a)

El pH_a se determinó PS de las muestras de orujo utilizando un Benchtop pH/mv meter (Sper Scientific).

II.2.2.10-Conductividad eléctrica (CE)

Se determinó la CE en el EPS de las muestras de orujo utilizando un Benchtop pH/mv meter (Sper Scientific). Los datos obtenidos se expresaron como mS/m⁻¹.

II.2.2.11-Obtención de la fracción soluble acuosa base seca (FSA_{bs})

Una muestra seca de orujo con un tamaño de partícula < 1 mm fue suspendido en agua destilada a una relación 1:5. La mezcla se agitó a 200 rpm durante 30 min y la solución resultante se centrifugó a 275 g. El sobrenadante obtenido se conservó a 4 °C.

II.2.2.12-Fenoles

La determinación del contenido de fenoles libres en la FSA_{bs} se realizó siguiendo la metodología reportada por Osono & Takeda (2001), empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu y como estándar una solución de ácido tánico (0,02 %, p/v). Para ello, a 100 µl de la muestra se le agregó 200 µl de solución acuosa de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1) y 1.100 µl de agua destilada y se incubó 3 min a temperatura ambiente, luego se

adicionaron 1.500 μl de solución de Na_2CO_3 al 2% en 0,1 N de NaOH y posteriormente se incubó 1 h a temperatura ambiente. La densidad óptica del complejo azul formado se determinó a 760 nm usando un espectrofotómetro (UV 160-A Shimadzu) y la concentración de grupos fenólicos libres en la muestra estimada fueron expresados como mg/g de orujo seco.

II.2.3- Análisis microbiológicos

Se cuantificó la carga de coliformes fecales y *Salmonella* spp en una muestra fresca compuesta de orujo de uva siguiendo la metodología reportada por Rashad et al. (2010) con modificaciones a través de un servicio a terceros realizada en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-La Plata). Los resultados obtenidos se expresaron como el NMP/g y el NMP/4 g de orujo fresco para coliformes fecales y *Salmonella* spp, respectivamente.

II.2.4- Bioensayos de fitotoxicidad

II. 2.4.1- Especies bioindicadoras

Como organismos bioindicadores se emplearon dos especies vegetales ampliamente reportadas para bioensayos de fitotoxicidad: lechuga (*Lactuca sativa* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* L.).

II.2.4.2 - Test de germinación-elongación radicular

El test se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Tiquia et al. (1996) con modificaciones (Tabla II.1). Para ello, las semillas fueron incubadas en cajas de Petri sobre papel de filtro cargado con un rango de diluciones de la FSA_{bs} de orujo. Previamente, las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (25 g de Cl activo/litro) durante 1 min y se enjuagaron varias veces con agua estéril. La FSA_{bs} se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito en el punto II.2.2.12, se esterilizó por filtración (0,2 μm de diámetro de poro) y se diluyó con agua destilada estéril de manera que la concentración final del extracto fuera 2,5; 5, 10 y 20 % (p/v). Las placas de Petri (9 mm de diámetro) conteniendo papel de filtro se esterilizaron en autoclave a 121 °C a 1,5 atm durante 20 min. Las placas conteniendo las semillas embebidas se incubaron en estufa (25 y 28 °C para lechuga y tomate, respectivamente) y oscuridad por 7 días; periodo tras el cual se determinó el número de semillas germinadas por placa y la longitud de la radícula. Un largo de radícula equivalente a 2

mm fue el parámetro que se utilizó para considerar a la semilla germinada. El porcentaje de germinación relativa (G), longitud radicular relativa (LR) e índice de germinación (IG) se calculó de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Ec. II.3 $G (\%) = (\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en presencia de la FSA a } X \% / \text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en el control negativo}) * 100$

Ec. II.4 $LR (\%) = (\text{promedio de la longitud radicular en presencia de la FSA a } X \% / \text{promedio de la longitud radicular en el control negativo}) * 100$

Ec. II.5 $IG (\%) = (G * LR) / 100$

Para cada tipo de semilla, se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado con un único factor de variación correspondiente a la concentración de la FSA, con cuatro repeticiones para cada uno de los tratamientos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA y test de Tuckey a posteriori ($p= 0,05$). Previo al análisis estadístico los datos fueron transformados a escala arcsen (Zar et al., 1999).

Tabla II. 1- Test de germinación-elongación radicular

Cantidad de semillas por placa	20 (lechuga) y 15 (tomate)
Volumen de la muestra/placa	3 ml
Rango de la FSA	2,5-20 % (p/v)
Control negativo	Agua destilada
Control positivo	SO ₄ Cu (1M)
Número de replicas	4
Condición lumínica	Oscuridad
Temperatura	24 ± 5 (lechuga) y 28 ± 5 (tomate) C°
Tiempo de incubación	7 días

2.4.3- Cultivo de plantas en macetas

El experimento presentó un diseño completamente aleatorizado con un único factor de variación correspondiente a la dosis de aplicación de orujo (0, 20, 40 y 80 t/ha, base húmeda). La Fig. II.1 muestra una representación esquemática de la metodología empleada. Plántulas con tres hojas expandidas fueron trasplantadas a macetas de 5 l

conteniendo una mezcla de suelo:arena sin esterilizar. El orujo fue adicionado y mezclado manualmente con los primeros 5 cm del suelo. Las plantas se cultivaron durante 30 días en invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura y riego, hasta capacidad de campo con agua en base a la demanda del sistema de cultivo. Las plantas cultivadas sin la incorporación de orujo al suelo (0 t/ha) se consideraron como control negativo de toxicidad. El peso seco de la biomasa aérea y radicular se determinó mediante gravimetría, para ello las muestras se secaron en estufa a 60 °C durante 48 h. El número de hojas expandidas se estimó por conteo directo y se determinó el área foliar por planta tomando fotografías sobre una superficie a escala que luego se analizaron usando el editor de imagen J software para calcular el área foliar (Schneider et al., 2012). El índice de verdor (IV) promedio de tres hojas expandidas al azar por planta se estimó usando el SPAD 502 (Minolta, Japón). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA y un Test de Tuckey a posteriori ($p=0,05$), excepto para el número de hojas que fue analizado mediante un ANOVA y un test a posteriori no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis).



Fig. II.1- Esquema representativo de la secuencia de pasos llevados a cabo para evaluar el efecto del orujo de uva sobre plantas test, usando como planta modelo el tomate.

II.3- RESULTADOS

En la tabla II.2 se presenta los resultados de los diferentes parámetros físico-químicos analizados en las muestras de orujo de uva de *V. labrusca* var. isabella (campañas 2015-2017). El orujo de uva presenta un alto contenido de MO respecto al contenido de cenizas. Entre los macronutrientes se destaca un alto contenido de potasio, que es el responsable de la alta base intercambiable (K^+) observada. Además, este subproducto en estado fresco es un material altamente higroscópico (79, 2 % de humedad). Se observó también un alto coeficiente de variación (≥ 20 %) en el contenido de COT, potasio, magnesio y el catión Mg^{+2} ; así como también, en la relación C/N.

Los análisis microbiológicos realizados mostraron que el orujo no contuvo coliformes fecales y *Salmonella* spp.

Tabla II.2- Parámetros físico-químicos: datos obtenidos para el orujo de uva de *V. labrusca* var. *isabella* y reportados para el orujo de uva de *V. vinífera*.

Parámetro	<i>V. labrusca</i>			<i>V. vinífera</i>
	Media	Rango	C.V. ¹	Media o rango
MO (%)	92,5	90,9-93,6	1,5	87,3-95,9 (a,b,c) ²
Cenizas (%)	7,5	6,4-9,1	18,9	4,1-12,7 (a,b,c)
COT (%)	47,1	34,2-55,1	23,9	21,8-48,6 (a,b,c)
NT (%)	2,1	2,0-2,2	5,8	1,7-2,5 (a,b,c)
C/N	22,4	16,6- 26,3	26,5	26,9 (a)
Potasio (g/Kg)	37,6	27,7-51,7	33,3	11,8–37,9 (b,c)
Sodio (mg/Kg)	64	57-75	15,1	71–1809 (b,c)
Calcio (g/Kg)	4,4	3,7-5,0	15,0	5,4–20,6 (b)
Magnesio (g/Kg)	0,7	0,5-0,8	23,2	0,7–2,2 (b)
Fósforo total (g/Kg)	3,1	2,9-3,4	8,6	0,62–1,72 (b)
CIC (cmol _c /Kg)	43,7	41,5-46,7	6,2	n.r. ³
K ⁺ (cmol _c /Kg)	49,3	43,9-54,1	10,4	n.r.
Ca ⁺⁺ (cmol _c /Kg)	7,2	6,6-7,6	7,2	n.r.
Mg ⁺⁺ (cmol _c /Kg)	0,9	0,4-1,7	72,9	n.r.
Na ⁺ (cmol _c /Kg)	0,4	0,4-0,5	21,0	n.r.
S (%)	132,4	125,7-137,7	4,64	n.r.
CE (dS/m)	5,8	5,4-6,1	6,1	3,3-5,4 (b)
pH _a	3,7	3,6-3,7	0,7	3,4–5,4 (a,b)
Humedad (%)	79,2	78,1-80,1	1,3	59,3-73,6 (a,c)
Fenoles (mg/g)	74,0	73,4-75,4	1,5	< 1(d)

Valores obtenidos a partir de los datos provenientes de las 3 muestras compuestas obtenidas durante las campañas de muestreo (2015-2017). 1- Coeficiente de variación. 2- Referencias bibliográficas: a- Ferrer et al. (2001), b- Bustamante et al. (2008), c- Toscano et al. (2013), d- Goula et al. (2016). 3- Valor no reportado.

La adición de la FSA_{bs} de orujo afectó la germinación (G), la longitud radicular (LR) y el índice de germinación (IG) relativos de semillas de lechuga y tomate (Tabla II.3). En las semillas de lechuga se observó que el incremento de la concentración de la FSA_{bs} de orujo en el rango de 2,5-10 % p/v provocó una reducción mayor al 50 % de la LR, mientras que la G no se vio afectada (G > 80 %). En cambio, en tomate, tanto la G como la LR se vieron afectadas similarmente con el incremento de la concentración de la FSA (2,5-10 % p/v). La FSA_{bs} al 20 % p/v inhibió totalmente la germinación en ambas especies bioindicadores. Las plántulas que desarrollaron en las placas inundadas con una concentración del FSA al 10 % presentaron una coloración parda en el extremo apical de la radícula de lechuga y tomate (Fig. II.2). Respecto al IG, se obtuvo valores comprendidos entre el 40-4 y el 80-9 % para lechuga y tomate, respectivamente.

Tabla II.3- Efecto de la FSA de orujo de uva sobre la germinación (G), la longitud radicular relativa (LR) y el índice de germinación (IG) de semillas de lechuga y tomate.

FSA (% p/v)	G (%)	LR (%)	IG (%)
- Lechuga			
2,5	95,8 ± 5,3 a	41,8 ± 2,2 a	40,1 ± 4,3 a
5	91,7 ± 7,2 ab	18,3 ± 2,9 b	16,9 ± 3,5 b
10	90,7 ± 2,7 b	4,3 ± 0,6 c	3,9 ± 0,6 c
20	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 d
- Tomate			
2,5	94,3 ± 6,5 a	84,7 ± 9,5 a	79,6 ± 7,1 a
5	77,6 ± 3,5 b	61,2 ± 6,1 b	47,4 ± 3,5 b
10	24,1 ± 8,1 c	39,3 ± 6,8 c	9,2 ± 2,7 c
20	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 d

Media y desvío de cuatro réplicas. Para cada columna y especie vegetal, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). Número de semillas germinadas en el control negativo (agua): 18 y 14,5 en lechuga y tomate, respectivamente. Longitud radicular en el control negativo (agua): $38,9 \pm 2,9$ y $34,8 \pm 1,8$ mm en lechuga y tomate, respectivamente. Control positivo (1 M de CuSO₄) sin germinación en ambas especies vegetales testeadas.

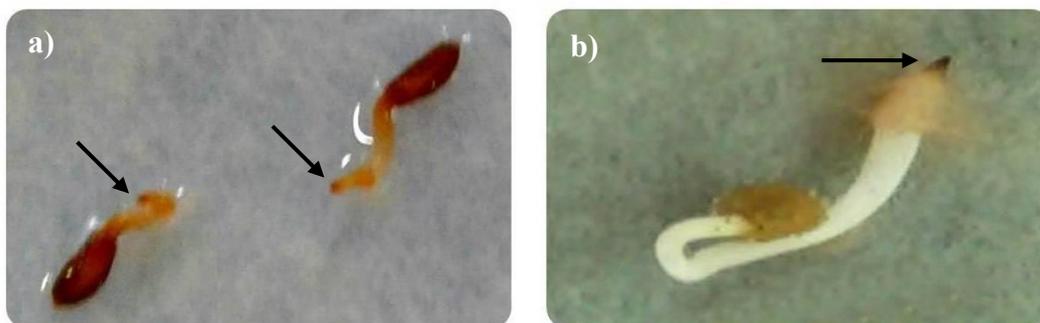


Fig. II.2- Coloración parda en el ápice radicular de semillas germinadas de lechuga (a) y tomate (b) expuestas a la FSA del orujo al 10 %.

El crecimiento y el índice de verdor (IV) de las plantas cultivadas en el invernáculo fueron afectados por la adición del orujo (Tabla II.4, Fig. II.3). El peso seco aéreo de lechuga se redujo un 37% al aplicar 20 t/ha y un 72 % con el agregado de 40 o 80 t/ha de orujo, en relación al control. Una dosis ≥ 40 t/ha de orujo provocó una reducción de un 58 % la biomasa aérea de tomate respecto al control, la menor dosis no presentó ningún efecto. Las plantas de lechuga que crecieron en suelos enmendados en el rango de 20-80 t/ha presentaron una reducción en el número de hojas del 18 %. En las plantas de tomate el número de hojas no fue afectado por la presencia de orujo en el sustrato ($p > 0,05$). La adición del orujo en el sustrato resultó en plantas con una menor área foliar que las testigos, alcanzando un máximo de inhibición de 71% para lechuga en el rango de 40-80 t/ha y de 48 % en tomate para la dosis de 80 t/ha. El efecto causado por el orujo sobre el IV fue diferente en relación a la especie usada. En lechuga se registró reducción del 23 % en el IV respecto al testigo, sin encontrar diferencias significativas entre las dosis de orujo aplicadas. En cambio, en tomate se detectó un incremento del 38 % en el IV cuando se mezcló al suelo a una dosis de 80 t/ha de orujo. El peso seco radicular (PSR) de ambas plantas presentó diferencias significativas en función a la dosis de orujo aplicada ($p < 0,05$). La adición de 20 t/ha de orujo incrementó un 32 y 23 % el PSR de lechuga y tomate, respectivamente, mientras que dosis comprendidas entre 40-80 t/ha inhibieron el crecimiento radicular un 45 y 33 % para lechuga y tomate, respectivamente. La incorporación de 20 t/ha de orujo al suelo promovió el desarrollo de raíces epigeas en las plantas respecto a aquellas cultivadas sobre el suelo desnudo (plantas testigo) (Fig II.4).

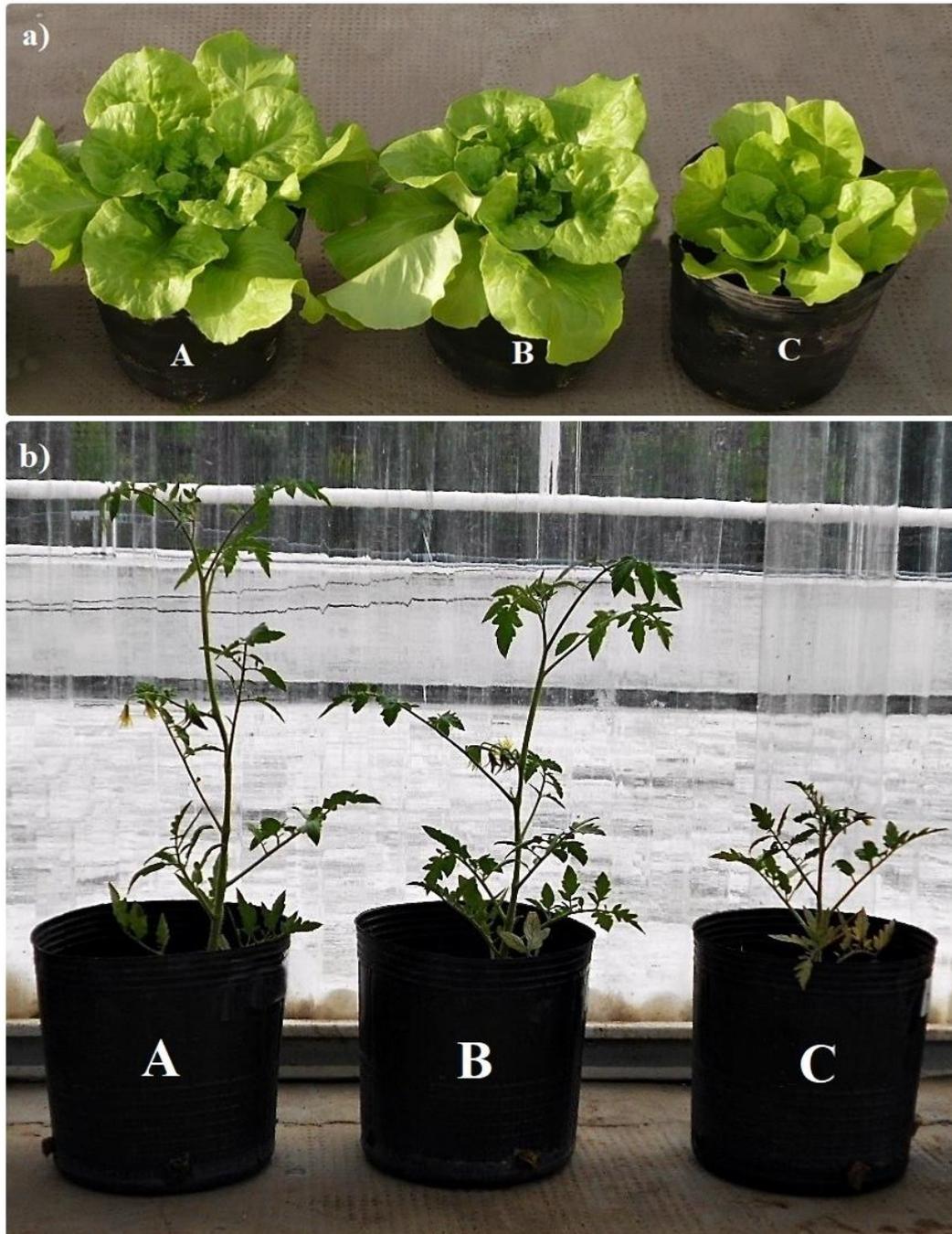


Fig. II.3- Efecto de la aplicación del orujo al suelo sobre el cultivo de plantas de lechuga (a) y tomate (b) después de 30 días de incubación. A, B y C corresponden a 0, 20 y 40 t/ha de orujo de uva, respectivamente.

Tabla II.4- Peso seco de la biomasa aérea (PSA), número de hojas expandidas (HE), área foliar total (AFT), índice de verdor (IV) y peso seco de la biomasa radicular (PSR) de plantas de lechuga y tomate cultivadas con dosis crecientes de orujo de uva durante 30 días.

Dosis (t/ha)	PSA (g/planta)	HE (nº/planta)	AFT (cm ² /planta)	IV (unidades SPAD)	PSR (g/planta)
- Lechuga					
0	3,6 ± 0,4 a	11 a	656,9 ± 85,3 a	28,2 ± 1,8 a	0,6 ± 0,1 b
20	2,3 ± 0,3 b	9 b	295,7 ± 18,9 b	19,8 ± 2,9 b	0,8 ± 0,1 a
40	1,0 ± 0,2 c	9 b	180,0 ± 30,7 c	23,3 ± 1,9 b	0,3 ± 0,0 c
80	1,0 ± 0,3 c	9 b	195,9 ± 41,7 c	22,1 ± 1,7 b	0,3 ± 0,0 c
- Tomate					
0	9,1 ± 2,2 a	11 a	552,1 ± 57,2 a	31,2 ± 4,0 b	0,6 ± 0,1 b
20	9,5 ± 0,6 a	11 a	548,7 ± 43,9 a	31,2 ± 1,9 b	0,8 ± 0,1 a
40	3,7 ± 1,1 b	10 a	275,7 ± 56,5 b	36,3 ± 4,8 ab	0,4 ± 0,0 c
80	4,0 ± 1,8 b	11 a	295,6 ± 41,2 b	38,1 ± 3,5 a	0,4 ± 0,1 c

Media y desvío o mediana de diez réplicas. Para cada columna y especie vegetal, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test, excepto para el nº de hojas que se analizó las diferencias mediante un test a posteriori no paramétrico).



Fig. II.3- Efecto de la aplicación del orujo al suelo sobre la biomasa radicular de tomate después de 30 días de incubación de orujo. A, B, C y D corresponden a 0, 20, 40 y 80 t/ha de orujo de uva, respectivamente.

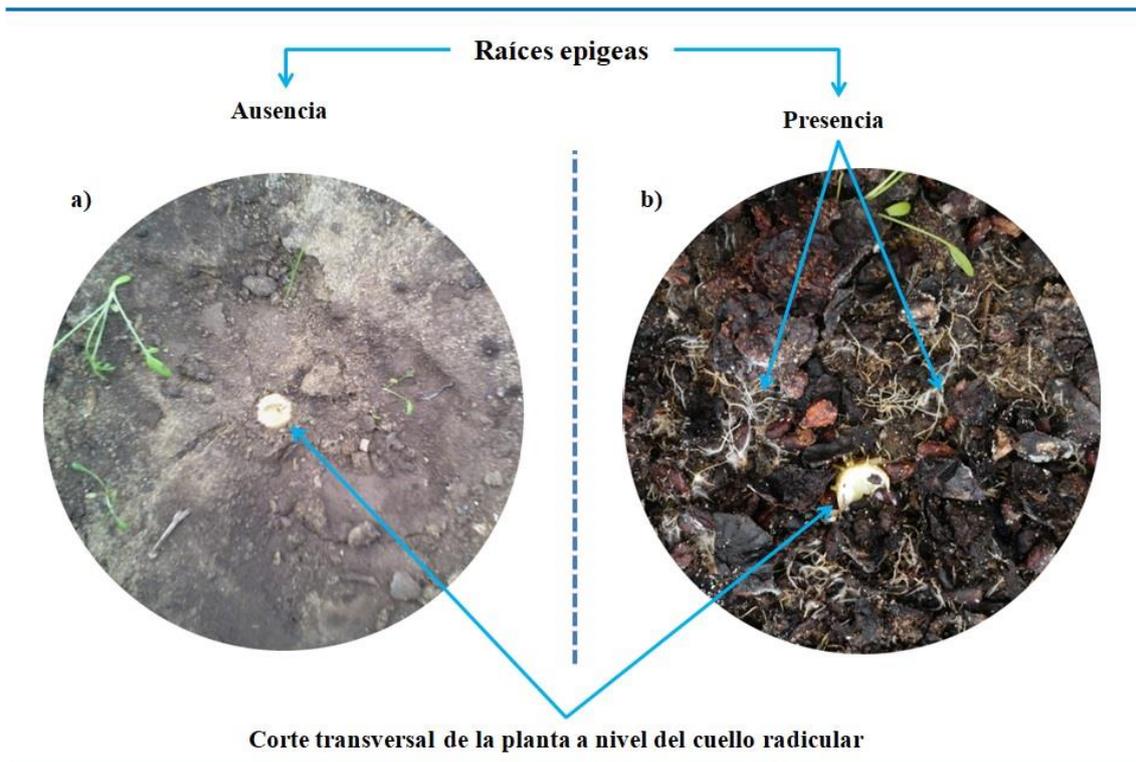


Fig. II.4- Efecto de la aplicación del orujo al suelo sobre desarrollo del sistema radicular epigeo de plantas de tomate cultivadas en macetas: (a) control y (b) 20 t/ha de orujo de uva.

II.4- DISCUSIÓN

La caracterización del orujo de uva de *V. labrusca* es un paso fundamental para la gestión adecuada de este subproducto como abono orgánico. En la tabla II.2 se datos bibliográficos obtenidos de la composición físico-química del orujo de *V. vinífera* con el fin de comparar los resultados del orujo de *V. labrusca*.

El alto contenido de MO encontrado en el orujo de *V. labrusca* fue similar al reportado para el de *V. vinífera* y otros subproductos agroindustriales tales como el alperujo y la pulpa de café, debido a su carácter lignocelulósico (Braham & Bressani, 1979; Albuquerque et al., 2004; Bustamante et al., 2009). Si bien el contenido de COT presentó un valor medio dentro del rango reportado para este tipo de subproducto, su alto coeficiente de variación sugiere que la fecha de muestreo tiene una mayor influencia sobre este valor que la especie de vid empleada.

A diferencia de los subproductos obtenidos en la industria oleica y cafetera, los orujos de uva presentan un mayor contenido de NT y una relación C/N (COT/NT) próxima al

límite recomendado para ser empleado como abono orgánico (< 25; CCQC, 2001; Pujol et al., 2013). Con lo cual, su empleo como abono no limitaría la disponibilidad del nitrógeno en el suelo. Respecto a otros nutrientes esenciales para las plantas, el orujo de *V. labrusca* presentó un alto contenido de K que es característico de estos subproductos vitivinícolas y un mayor contenido de PT respecto a lo reportado para *V. vinífera*, resultando ser el subproducto de *V. labrusca* más atractivo desde el punto de vista agronómico (Bustamante et al., 2009). En cambio, un menor contenido de Ca se evidenció en el orujo de *V. labrusca* que podría deberse a que los viñedos de esta vid no se encuentran emplazados sobre suelos calcáreos (ricos en calcio) necesarios para la producción de vinos de alta calidad como los de *V. vinífera* (Almanza Merchán, 2012). La incorporación del orujo de *V. labrusca* como abono orgánico podría afectar la calidad de frutos, en términos de firmeza, puesto que este nutriente juega un rol crucial en la formación de la pared celular vegetal.

El orujo de *V. labrusca* posee un valor de CIC similar a suelos clasificados como altamente fértiles (> 45), esto se puede deber a la disponibilidad de grupos funcionales cargados negativamente (fenoles, ácidos carboxílicos, etc) presentes en la materia orgánica (Garrido Valero, 1994). Por lo tanto es de esperar que la adición de orujo de uva al suelo reduzca el lixiviado de los cationes de nutrientes esenciales e incremente su disponibilidad para los cultivos (Scotti et al., 2015). Con respecto al contenido de cationes intercambiables, el orujo presentó una provisión muy alta de K^+ , media de Ca^{++} y baja de Mg^{++} (INTA, 1989). Esta dominancia de K podría limitar la disponibilidad Ca y el Mg, provocando deficiencias de estos nutrientes esenciales durante el crecimiento de las plantas (Hayward & Wadleigh, 1949).

Un valor de CE superior al valor límite establecido para abonos orgánicos (4 dS/m) se registró en el orujo de *V. labrusca*, este alto contenido salino restringe su uso sobre cultivos sensibles (Resolución SENASA 264/11, 2011); aunque este valor podría deberse al alto porcentaje de saturación de bases encontrado. Es conocido que los suelos con una saturación de bases cercana o del 100 % presentan un pH alcalino (Garrido Valero, 1994); en el caso del orujo, a pesar de presentar un valor de saturación mayor, es un subproducto ácido. Esto se debe principalmente a la presencia de ácidos orgánicos propios de la uva: ácido málico y tartárico, que junto con el contenido de K y su efecto sobre la disminución del ácido tartárico libre determinan la acidez (Boulton, 1980).

Por otro lado, el alto contenido de humedad de este subproducto se corresponde con el rango reportado para el orujo de *V. vinifera* y otros residuos agroindustriales tales como el alperujo y la pulpa de café (Braham & Bressani, 1979; Albuquerque et al., 2004), cuyos valores varían entre 64-80 %. Tal característica representa un costo alto en el transporte, en términos económicos, y conlleva a un problema en el almacenaje del subproducto puesto que resulta muy susceptible al deterioro por acción de los microorganismos, perdiendo valor agregado cuando su predigestión no es controlada. Al comparar el tenor fenólico entre ambos orujos se evidenció un mayor contenido para *V. labrusca*; esta diferencia encontrada podría deberse al tipo y proporción de fenoles que presenta cada variedad de vid o a variaciones en la metodología de extracción (Goula et al., 2016).

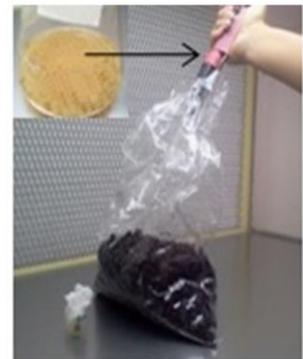
En relación a los niveles máximos permitidos en la legislación sobre la carga de microorganismos patógenos, la ausencia de coliformes fecales y *Salmonella* spp en el orujo de *V. labrusca* favorece su empleo como abono orgánico (Resolución SENASA 264/11, 2011).

A pesar de cumplir con este requerimiento sanitario y presentar características de interés agronómico (MO, N, P, K), el orujo de uva de *V. labrusca* resultó ser nocivo para el crecimiento y de desarrollo de semillas y plantas de lechuga y tomate. En el test de germinación-elongación radicular, la germinación fue menos sensible a la presencia de sustancias fitotóxicas presentes en la FSA_{bs} del orujo que el crecimiento radicular, posiblemente porque durante esta etapa prima la adquisición de agua para salir del estado de dormición (Paradelo et al., 2012). Sin embargo, entre las dos especies testeadas, las sustancias tóxicas presentes en la FSA_{bs} de orujo ejercieron un mayor efecto inhibitorio sobre lechuga (IG < 80 %; Zucconi et al., 1981). Esto indica que el grado de toxicidad depende del rango de tolerancia de la especie empleada, tal como fue reportado por otros autores (Paradelo et al., 2012; Selim et al., 2012). La coloración parda en el ápice radicular podría ser el resultado de una necrosis celular causada por los compuestos tóxicos suplementados por la FSA o la polimerización de compuestos (cromóforos) del exudado radicular ante el estrés impuesto por esta última. Este síntoma podría coincidir con el efecto aleloquímico reportado para la FSA de *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) sobre el crecimiento radicular en semillas de tomate (Romero-Romero et al., 2005). Dentro de los compuestos aleloquímicos se encuentran los fenoles, cuyo mecanismo de acción parece estar relacionado a la narcosis polar (alteración de la

estructura y función de la membrana celular), el desacoplamiento de la oxidación, alteraciones de electrofilicidad, de hidrofobicidad y disociación y unión de H en las biomoléculas (Wang et al., 2002; Ren, 2003). Puesto que el orujo de *V. labrusca* tiene compuestos fenólicos, estas sustancias podrían contribuir directamente o a través de la acción sinérgica con otros compuestos a la inhibición evidenciada sobre el crecimiento radicular. En relación al cultivo en invernáculo, el agregado de orujo al suelo también produjo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las plantas, reafirmando la mayor sensibilidad de la lechuga a este subproducto y en contraposición a lo observado tras aplicar alpeorujo al suelo (Martín et al., 2002; Sampedro et al., 2005). Este resultado, además, refuerza la hipótesis de la presencia de sustancias tóxicas en el orujo, pero también sugiere otras derivadas de la degradación microbiana del mismo bajo la condición de cultivo impuesta. Reportes previos indican que la aplicación al suelo de materia orgánica fresca o después de un proceso de predigestión aún en una etapa inmadura ocasiona efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas, coincidiendo con los resultados obtenidos (Tiquia et al, 1996; Martín et al., 2002; Sampedro et al, 2005). En contraposición, un efecto estimulante del orujo fue observado sobre el sistema radicular de las plantas al adicionar 20 t/ha, esto podría deberse a la formación de agregados que reducen la compactación del suelo y facilitan la penetración radicular; y por otro lado el incremento de nutrientes esenciales para las plantas (Diacono & Montemurro, 2011). En suelos utilizados para el cultivo intensivo de lechuga y tomate, se ha recomendado una dosis entre 10 a 80 t/ha de abono orgánico para mantener la capacidad productiva del mismo; los resultados obtenidos restringen el uso del orujo para tal fin agronómico (Vazquez & Terminiello, 2012).

CAPÍTULO III

**LA TRANSFORMACIÓN
DEL ORUJO DE UVA DE
VITIS LABRUSCA CON
HONGOS SAPRÓTROFOS
BAJO CONDICIONES DE
FES**



I.1- INTRODUCCIÓN

La “Cooperativa de la Costa” (Buenos Aires, Argentina) emplea las uvas de *V. labrusca* var. *isabella* (L) para producir un vino regional que genera residuos orgánicos sin ningún tipo de tratamiento (Abbona et al., 2007; Sisterna et al., 2010; Otero, 2013; Velarde et al., 2013). El más importante es el orujo de uva (hollejo, pulpa remanente y semillas), con una composición química de 10,3 % de celulosa, 12,0 % de hemicelulosa y 37,2 % de lignina (Saparrat et al., 2009). Este subproducto contiene una cantidad de materia orgánica importante que permitiría mejorar las propiedades y el contenido de nutrientes esenciales, especialmente N y K, que estimularían el crecimiento de las plantas (Capítulo II). Sin embargo, su uso agronómico se halla restringido a enmienda orgánica o acondicionador de suelos, debido ciertas características físico-químicas del orujo y a la presencia de sustancias tóxicas que afectan negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas (Capítulo II; Tiquia et al., 1996).

Los hongos saprófitos son conocidos por su capacidad para transformar y acelerar el proceso de degradación de distintos tipos de residuos o subproductos agrícolas o agro-industriales bajo condiciones de FES, por ejemplo: paja de trigo, paja de arroz, alperujo y restos de la post-cosecha de la caña de azúcar (Dorado et al., 1999; Sampedro et al., 2005, 2007; Dinis et al., 2009; Yu et al., 2009; Maza et al., 2014). Esto se debe a que estos hongos penetran con sus hifas la matriz sólida lignocelulósica y sintetizan una alta cantidad de enzimas extracelulares que incrementan el acceso a los nutrientes disponibles en el mismo, en condiciones de baja actividad agua y altas presiones osmóticas (Díaz et al., 2007). Entre las enzimas liberadas se diferencian las de naturaleza hidrolíticas, que actúan en la degradación de los polisacáridos de la pared celular (celulosa y hemicelulosa), y las oxidativas no específicas que mineralizan y oxidan la lignina y un amplio rango de compuestos con una estructura similar a ésta (Saparrat et al., 2002, 2008a, 2010; Maza et al., 2015). Se ha reportado la capacidad de *Aspergillus awamori* para sintetizar xilanasa y exo-poligalacturanasa usando el orujo de uva como sustrato de crecimiento (Botella et al., 2005, 2007; Díaz et al., 2007). También se ha detectado la producción de lacasa en cultivos de *Trametes hirsuta* usando semillas de uva bajo FES (Moldes et al., 2003). Sin embargo, no hay antecedentes sobre los cambios generados en la matriz lignocelulósica del orujo por la acción de los hongos saprófitos bajo FES.

Debido a que la FES con hongos es un proceso complejo, que implica seleccionar una cepa fúngica, el tipo de sustrato y las condiciones de cultivo adecuadas para la actividad fúngica; en este capítulo se describe la evaluación de la capacidad de seis hongos saprótrofos para transformar el orujo de uva de *V. labrusca*, considerando los cambios químicos generados en el sustrato y los mecanismos enzimáticos involucrados en el proceso.

III.2- MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1- Aislamientos fúngicos y su mantenimiento

Para estos estudios se utilizaron 5 cepas depositadas en el Cepario del Instituto Carlos Spegazzini de La Plata (LPSC) y 1 depositada en el Cepario de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (FALH), las cuales presentan características fisiológicas diferenciales y cuya información se detalla en la Tabla III.1. El mantenimiento de la mayoría de las cepas fúngicas se realizó mediante subcultivos en estrías de medio agar extracto de malta (AEM; 20 g de extracto de malta, 2 g de extracto de levadura y 20 g de agar en 1l) que se conservaron a 4 °C, con excepción de *T. harzianum*, para el que se empleó como medio agar papa glucosa (250 g de papa; 20 g de glucosa y 20 g de agar en 1l).

Tabla III.1 – Aislamientos fúngicos

Especie	Cepa	Sustrato de aislamiento	Referencia
<i>Corioloopsis rigida</i>	LPSC # 232	Madera (PB)*	Saparrat et al., 2000, 2002, 2010
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	LPSC # 735	Madera (PC)	Murace et al., 2010
<i>Peniophora albobadia</i>	LPSC # 285	Madera (PB)	Saparrat et al., 2000, 2002
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	LPSC # 163	Madera (PB)	Saparrat et al., 2000, 2002; Luna et al., 2004
<i>Trichoderma harzianum</i>	FALH # 18	Suelo	Stocco, 2014
<i>Ulocladium botrytis</i>	LPSC # 813	Hojarasca	Saparrat et al., 2007, 2008b

* Las abreviaturas entre paréntesis indica el grupo ecofisiológico al que pertenece el hongo: PB, hongo de pudrición blanca y PC, hongo de pudrición castaña.

III.2.2- Tratamiento del orujo de uva con los hongos saprótrofos bajo FES

III.2.2.1- Producción del inóculo

Los hongos se cultivaron individualmente sobre medio AEM a 28 °C durante 5 días en oscuridad, excepto *T. harzianum* el cual se incubó durante 2 días debido a su alta tasa de crecimiento en comparación con el resto de los aislamientos empleados (Fig. III.1). Tres discos de 6 mm de diámetro se cortaron del borde de crecimiento activo de la colonia y se inocularon en Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 20 ml de medio líquido de extracto de malta. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación (200 rpm) durante 5 días a 28 °C en oscuridad. Posteriormente, el micelio desarrollado contenido en cada Erlenmeyer se lavó con agua destilada estéril y se homogeneizó asépticamente; la suspensión resultante se empleó como inóculo. La biomasa fúngica inoculada se determinó mediante gravimetría por triplicado (Saparrat et al., 2007). La biomasa fúngica inoculada se determinó mediante gravimetría por triplicado (Saparrat et al., 2007). Una alícuota de 10 ml de la suspensión a aplicar se secó a 60 °C y se calculó su masa seca, la que se expresó en mg/ml. Una representación esquemática de la secuencia de trabajo se muestra en la Fig. III.2.

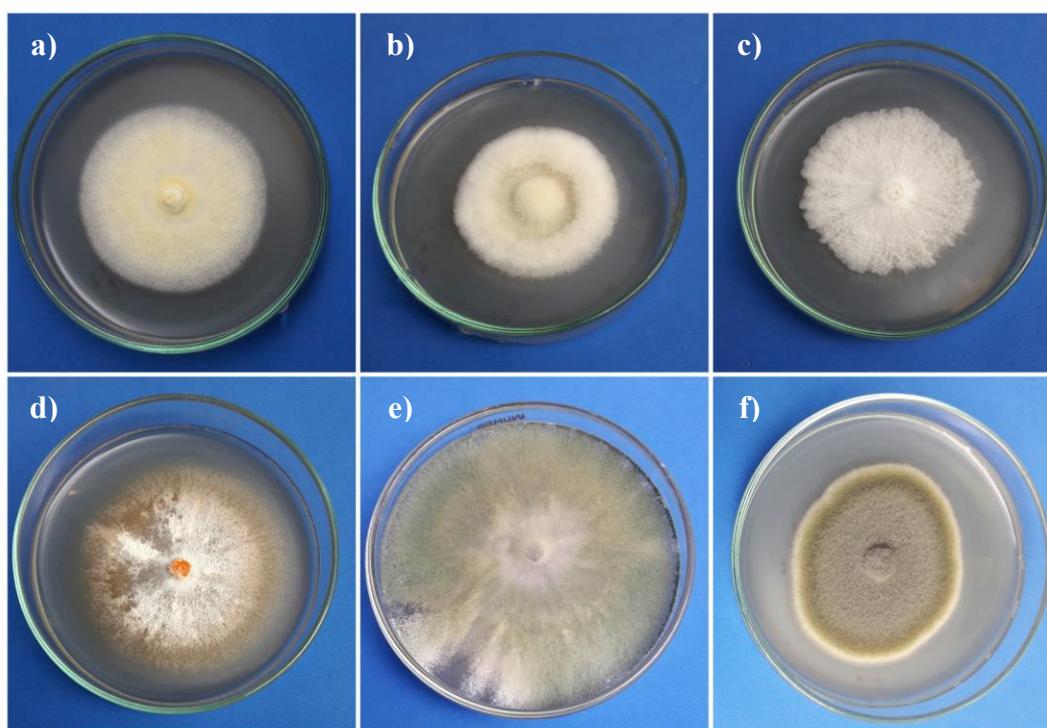


Fig. III.1 – Cultivo en placa de los hongos saprótrofos sobre medio AEM: (a) *C. rigida*, (b) *G. sepiarium*, (c) *P. albobadia*, (d) *P. sanguineus*, (e) *T. harzianum* y (f) *U. botrytis*.

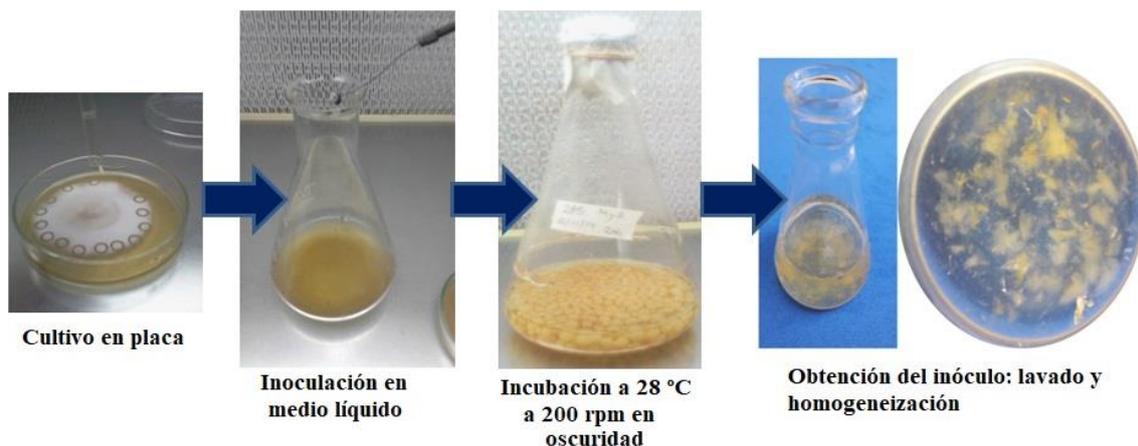


Fig. III.2 – Secuencia de trabajo realizada para la obtención del inóculo fúngico.

III.2.2.2- Cultivo de los hongos saprótrofos

Se evaluó la habilidad de los hongos para colonizar y transformar el orujo de uva bajo condiciones de FES. Se consideró un diseño experimental completamente aleatorizado con dos factores de variación, como primer factor de variación se consideró el tratamiento del orujo de uva con los distintos hongos y como segundo factor el tiempo de incubación. En bolsas de polipropileno (18 x 5 cm) se fraccionó 30 gr de orujo estéril (autoclavado a 121 °C a 1,5 atm durante 30 min), con un contenido de humedad ajustado al 70%, el cual se inoculó con una suspensión al 20 % p/v ($3,0 \pm 0,65$ mg/ml) obtenida en base al punto III.2.2.1. Cada bolsa se cerró empleando un cilindro de policloruro de vinilo (PVC) con tapón de algodón para permitir el intercambio gaseoso. Las bolsas inoculadas se incubaron en oscuridad a 28 °C. En paralelo se dispusieron bolsas sin inocular a modo de control, incluyendo 4 que se procesaron al tiempo inicial del ensayo. A intervalos de 30 días, 4 muestras (bolsas) al azar de cada tratamiento se removieron sin reposición, incluyendo del grupo control, para una verificación visual y microscópica del desarrollo micelial y además para la determinación de los parámetros que se detallan a continuación. La Fig. III.3 muestra la secuencia de trabajo realizada para el cultivo de los hongos bajo FES.

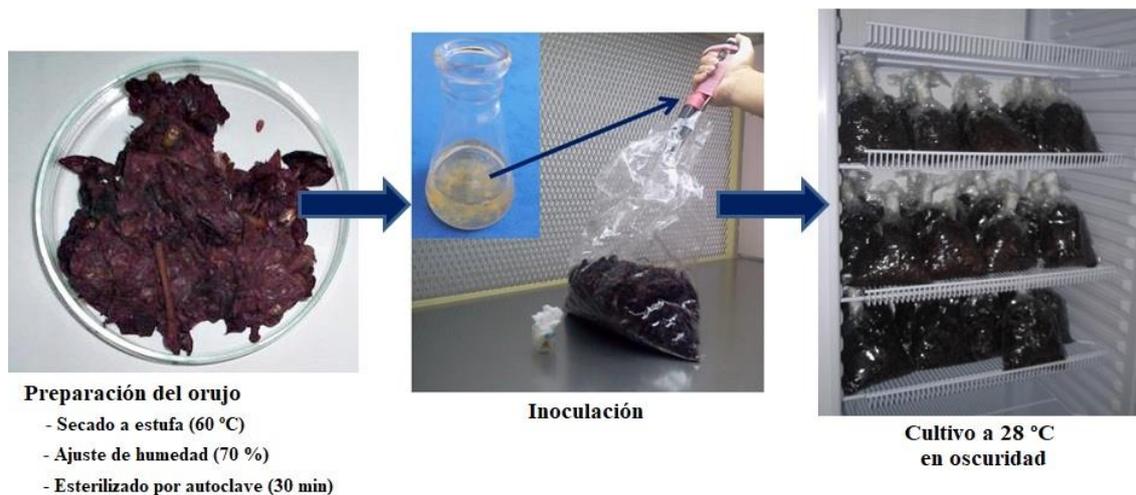


Fig. III.3 – Secuencia de trabajo realizada para el cultivo de los hongos bajo FES.

III.2.3-Determinaciones analíticas y actividades enzimáticas

III.2.3.1-Pérdida de peso

La pérdida de peso (Pp, expresada en %) de las muestras se determinó mediante el secado de las mismas a 60 °C. La diferencia de peso por tratamiento fúngico se calculó con respecto al sustrato sin inocular (Saparrat et al., 2008b).

III.2.3.2-Acondicionamiento de la fracción sólida (FS)

Las muestras secas se molieron a un tamaño de partícula < 1mm y se almacenaron en bolsas herméticas rotuladas hasta su empleo.

III.2.3.3-Color

El color se evaluó en las muestras de la FS empleando un medidor de color (colorímetro Chroma (CR300, Minolta, Osaka, Japón), siguiendo la metodología reportada por Okino et al. (2009) con modificaciones. Se realizaron tres réplicas técnicas por muestra o réplica biológica, las cuales se promediaron previamente al análisis estadístico. Los parámetros medidos fueron: L*, que es una medida de la luminosidad (0 corresponde a negro y 100 a blanco); a* que representa el color en el rango rojo-verde (valores positivos a negativos); b* que designa los valores en el rango amarillo-azul (valores positivos a negativos). Se calculó la variación total de color (ΔE) usando las siguientes ecuaciones:

Ec. III.1 $\Delta X = X_i - X_c$

Ec. III.2 $\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$

donde X representa a un componente del color: L^* , a^* o b^* . El subíndice i corresponde al valor de la muestra tratada con un hongo para un parámetro X para un determinado tiempo de cultivo y c representa el valor de la muestra control (sin tratamiento fúngico) para ese mismo parámetro y tiempo de cultivo.

III.2.3.4 -Espectroscopía FT-Raman

Los espectros FT-Raman de las muestras de la FS del orujo de uva control y tratado con los hongos saprótrofos correspondientes a los 90 días de incubación se obtuvieron a una resolución de $50\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ usando un Microscopio Raman DXR (Thermo Fisher Scientific), a temperatura ambiente. Los datos fueron colectados usando una bomba de diodo con un láser verde de estado sólido de 532 nm a una potencia de 9 mW (resolución espectral de 4 cm^{-1}) y una apertura confocal de hendidura de $50\text{ }\mu\text{m}$. Las muestras se enfocaron con un objetivo de $10\times$. Tres réplicas técnicas por muestra se realizaron para obtener un espectro promedio. Los espectros obtenidos se analizaron usando OMNIC software (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, USA). Se obtuvieron los datos de intensidad (I) a 1096 cm^{-1} (estiramiento de los enlaces C-C y C-O), 1600 cm^{-1} (estiramiento del anillo arilo, simétrico) y 1739 cm^{-1} (estiramiento en el enlace ν (C=O) del grupo éster) atribuidos a celulosa, lignina y hemicelulosa, respectivamente (Heredia-Guerrero et al., 2014; Durmaz et al., 2016) y se calcularon las relaciones de $I\ 1600\text{ cm}^{-1}/I\ 1739\text{ cm}^{-1}$, $1600\text{ cm}^{-1}/I\ 1096\text{ cm}^{-1}$ y $I\ 1739\text{ cm}^{-1}/I\ 1096\text{ cm}^{-1}$ a fin de identificar alteraciones de la matriz lignocelulósica como resultado del tratamiento fúngico (Durmaz et al., 2016 modificado).

III.2.3.5-Obtención de la fracción soluble acuosa base húmeda (FSA_{bh})

Una fracción fresca (10 g) del orujo tratado y no tratado con los hongos saprótrofos se le adicionó 50 ml de agua destilada. La mezcla resultante se agitó a 200 rpm durante 30 min , tras los cuales se filtró y centrifugó a 275 g . Alicuotas de la FSA_{bh} obtenida se conservaron a $4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su empleo.

III.2.3.6- Fenoles libres

El contenido de fenoles libres se determinó en la FSA_{bh} siguiendo la metodología reportada en el punto II.2.2.12.

III.2.3.7- pH hidrolítico (pH_h)

El pH_h se determinó en la FSA_{bh} utilizando un Benchtop pH/mv meter (Sper Scientific).

III.2.3.8- NH₄⁺-N

El contenido de NH₄⁺-N en la FSA_{bh} se determinó por el método de King et al. (1990). A 100 µl de la FSA_{bh} de cada muestra se le adicionaron 500 µl del reactivo A y 500 µl del reactivo B. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se determinó la densidad óptica a 635 nm usando un UV- espectrofotómetro (160-A Shimadzu). El reactivo A contiene fenol al 1% (p/v) y Na₂ [Fe(CN)₅NO] al 0,005 % (p/v). El reactivo B contiene NaOH al 0,5% (p/v) e NaClO al 0,84% (v/v). Se empleó como estándar una solución de Cl (NH₄) al 0,002 % (p/v).

III.2.3.9- Azúcares reductores

Se determinó el contenido de azúcares en la FSA_{bh} siguiendo la metodología de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945). La reacción colorimétrica se llevo a cabo en tubos de ensayos conteniendo 200 µl de muestra y 200 µl de reactivo Somogyi, los cuales fueron sumergidos en baño a 100 °C por 10 min. Se dejó enfriar y se adicionó 200 µl del reactivo de Nelson y 2,4 ml de agua destilada. La lectura se realizo a 540 nm un espectrofotómetro (UV 160-A Shimadzu). Se empleó como estándar una solución 10 mM de glucosa.

III.2.3.10- Cromóforos

En las FSA_{bh} se determinó el contenido de cromóforos midiendo la absorbancia a 395 nm en un UV- espectrofotómetro (160-A Shimadzu) siguiendo a Aloui et al. (2007).

III.2.3.11- Actividad β-1,4 endoglucanasa y β-1,4 endoxilanasas

La actividad de β-1,4 endoglucanasa y β-1,4 endoxilanasas se determinó utilizando como sustrato carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5 % y xilano al 0,2 % en buffer Acetato de sodio 50 mM a pH 5, respectivamente (Saparrat et al., 2008b). La liberación de azúcares reductores se determinó por la técnica de Somogyi-Nelson (ver punto III.2.3.9). La reacción se realizó con 200 µl de la FSA_{bh}, incubada con el sustrato a 50 °C durante 60 min. Los resultados fueron expresados en miliunidades por mililitro de FSA_{bh} (mU/ml).

III.2.3.12- Actividad lacasa y peroxidasa

La actividad lacasa fue determinada por oxidación de ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)] 50 mM, en buffer acetato 500 mM de pH 5,5 (Saparrat et al., 2000). En la mezcla de la reacción se midió el incremento lineal de la

absorbancia a 436 nm (λ_{436} : 29.300 M⁻¹cm⁻¹) en un espectrofotómetro (UV 160-A Shimadzu). La actividad peroxidasa también se determinó en base a la cinética de oxidación del ABTS en presencia de peróxido de hidrógeno 0,1 mM. La actividad enzimática oxidativa se expresó en miliunidades por mililitro de líquido de cultivo (mU/ml). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de ABTS oxidado/min.

III.2.4- Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA uni o bifactorial y un Test de Tuckey a posteriori ($p=0,05$). Los datos correspondientes al porcentaje de pérdida de peso se transformaron a escala arcsen previo al análisis estadístico (Zar et al., 1999).

III.3- RESULTADOS

Todos los hongos colonizaron el orujo contenido en las bolsas luego de los 90 días de incubación (Fig. III.4). Mientras que los cultivos de *C. rigida* sobre orujo se caracterizaron por ser compactos, cementando los componentes de partida en una unidad (Fig. III.5), los cultivos de los otros hongos no generaron la agrupación entre los componentes del sustrato. Aunque los cultivos pertenecientes a Basidiomycota (*C. rigida*, *G. sepiarium*, *P. albobadia* y *P. sanguineus*) sólo diferenciaron hifas vegetativas características (datos no mostrados), aquellos correspondientes a *T. harzianum* y *U. botrytis* mostraron sus conidios distintivos desde los primeros 30 días de cultivo (Fig. III.6).



Fig. III.4 – Colonización del orujo de uva por los hongos saprótrofos después de 90 días de incubación bajo condiciones de FES: (a) *C. rigida*, (b) *G. sepiarium*, (c) *P. albobadia*, (d) *P. sanguineus*, (e) *T. harzianum* y (f) *U. botrytis*.

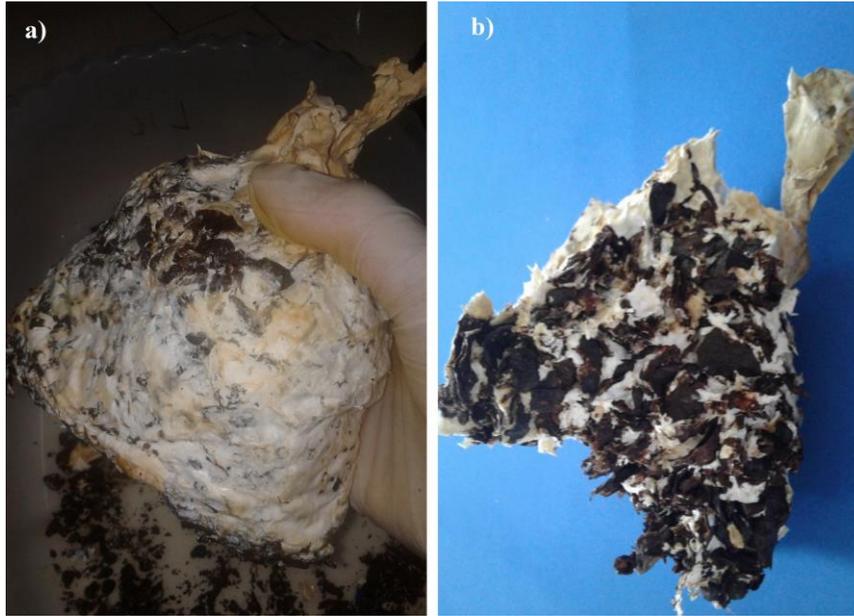


Fig. III.5 – Orujo de uva colonizado por *C. rigida* a los 90 días de incubación: (a) cultivo formando un bloque compacto en ausencia del recipiente contenedor (bolsa) y (b) alicotado mostrando una masa miceliar agregando los componentes de partida del orujo.

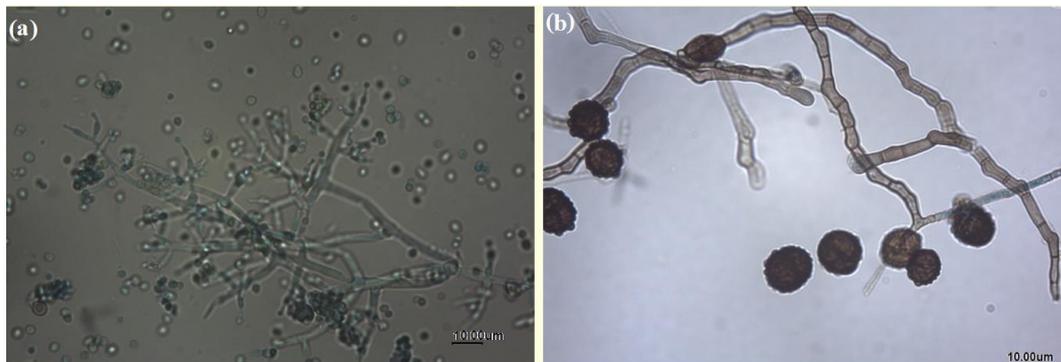


Fig. III.6 – Observación de hifas y sistema conidial de (a) *T. harzianum* y (b) *U. botrytis* con un aumento de 40x.

Se encontraron diferencias en el porcentaje de pérdida de peso del orujo por la actividad de los hongos, aunque ello fue dependiente del tiempo de incubación (Fig. III.7). *U. botrytis* después de los 30 días de cultivo sólo redujo un $7,8 \pm 1,1$ % el peso del orujo comparado al resto de los cultivos fúngicos analizados, no obstante, este hongo causó la mayor pérdida de peso a los 90 días de incubación ($32,1$ % $\pm 1,7$).

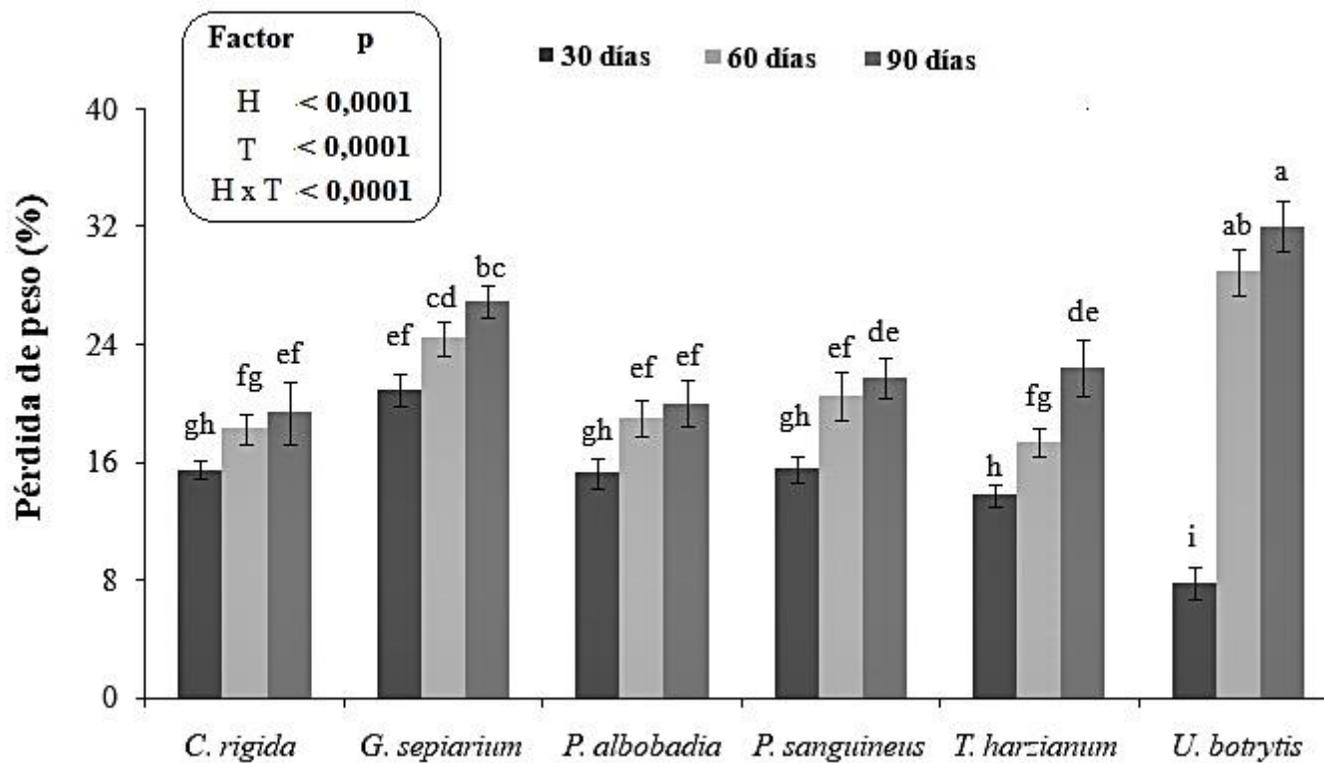


Fig. III.7 - Pérdida de peso (%) del orujo de uva causada por los hongos saprófitos (H) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negra los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

La Fig. III. 8 muestra los cambios de color superficial generados en la FS de los orujos tratados con los hongos saprótropos a los distintos tiempos de incubación respecto al control. En base al sistema CIELAB, el tratamiento del orujo con los hongos generó variaciones en los valores de los parámetros L^* , a^* y b^* , así como, en la ΔE ; en los tiempos de exposición respecto a las muestras control (Fig. III. 9-12). En relación con el parámetro L^* , un claro aumento en la luminosidad del $9,5 \pm 4,3$ % se produjo en las muestras que se trataron con *G. sepiarium* a los 30 días de incubación respecto al control; mientras que una reducción de la luminosidad del $18,1 \pm 6,9$ % se observó en la FS de las muestras tratadas con *U. botrytis* independientemente del tiempo de cultivo (Fig. III.9). La Fig. III.10 muestra que las diferencias encontradas en la variación del rango de color de rojo a verde (parámetro a^*) no se ocasionó por el efecto interactivo entre las variables analizadas (tipo de tratamiento y tiempo de cultivo). Entre los hongos evaluados, sólo *C. rigida*, *T. harzianum* y *U. botrytis* enverdecieron la FS del orujo respecto al control, siendo *U. botrytis* el hongo que causó la máxima en el rango de color ($76,7 \pm 12,9$ %). En relación al parámetro b^* , las diferencias encontradas en el rango de color de amarillo azul se deben a la interacción que surge entre el tipo de tratamiento y el tiempo de cultivo (Fig. III.11). Mientras que las FS correspondientes al orujo tratado con *C. rigida* y *G. sepiarium* se tornaron más amarillentas a los 30 y 60 días de incubación respecto al control correspondiente; este mismo efecto se evidenció a partir de los 60 días en las FS tratadas con *P. albobadia* y *P. sanguineus*, respecto al control. En cambio, las FS de las muestras correspondientes a *T. harzianum* y *U. botrytis* presentaron un desplazamiento del color hacia el azul respecto al control, destacándose en los 3 tiempos de incubación *U. botrytis*. La combinación de los parámetros L^* , a^* y b^* reveló diferencias en el cambio de color (ΔE) de la FS de los orujos tratados con los hongos en función del tiempo de incubación, siendo *U. botrytis* el hongo que produjo la máxima variación del color a los 90 días de incubación (Fig. III.12).

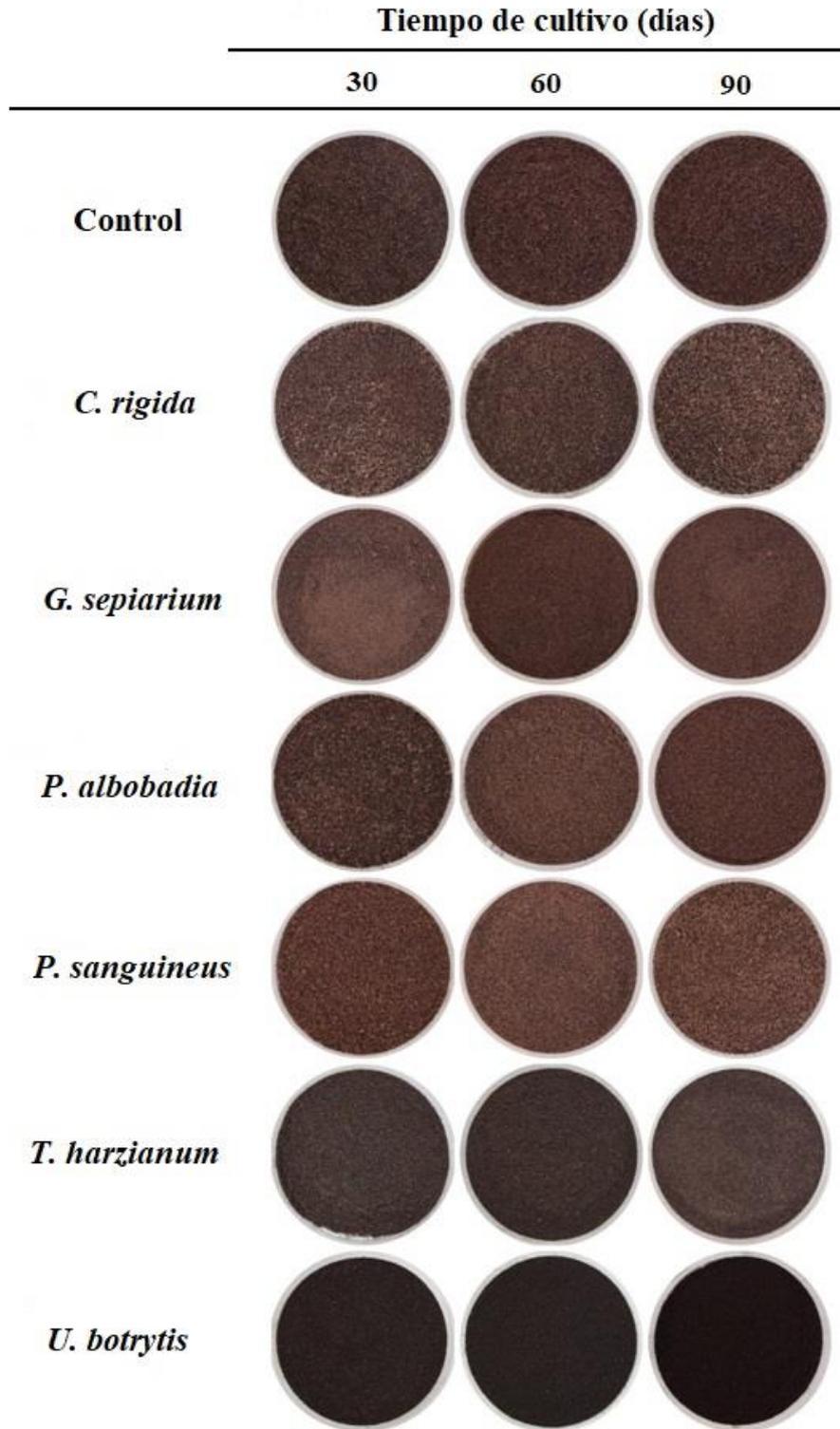


Fig. III.8 - Color del orujo de uva control y tratado con los hongos saprótrofos después de 30, 60 y 90 días de incubación.

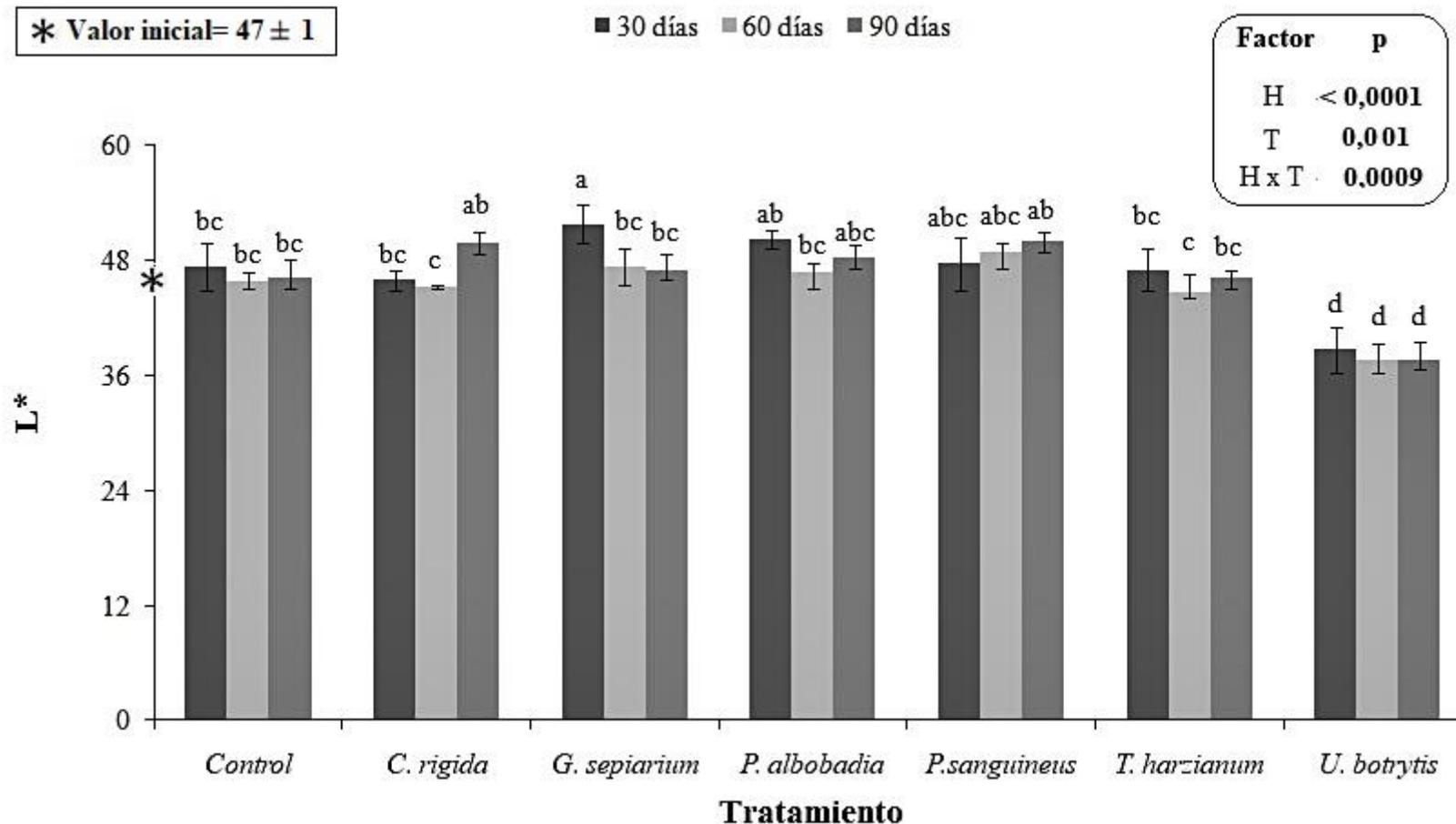


Fig. III.9 - Componente L* del color de la FS del orujo de uva control y tratado con los hongos saprófitos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, p<0,05).

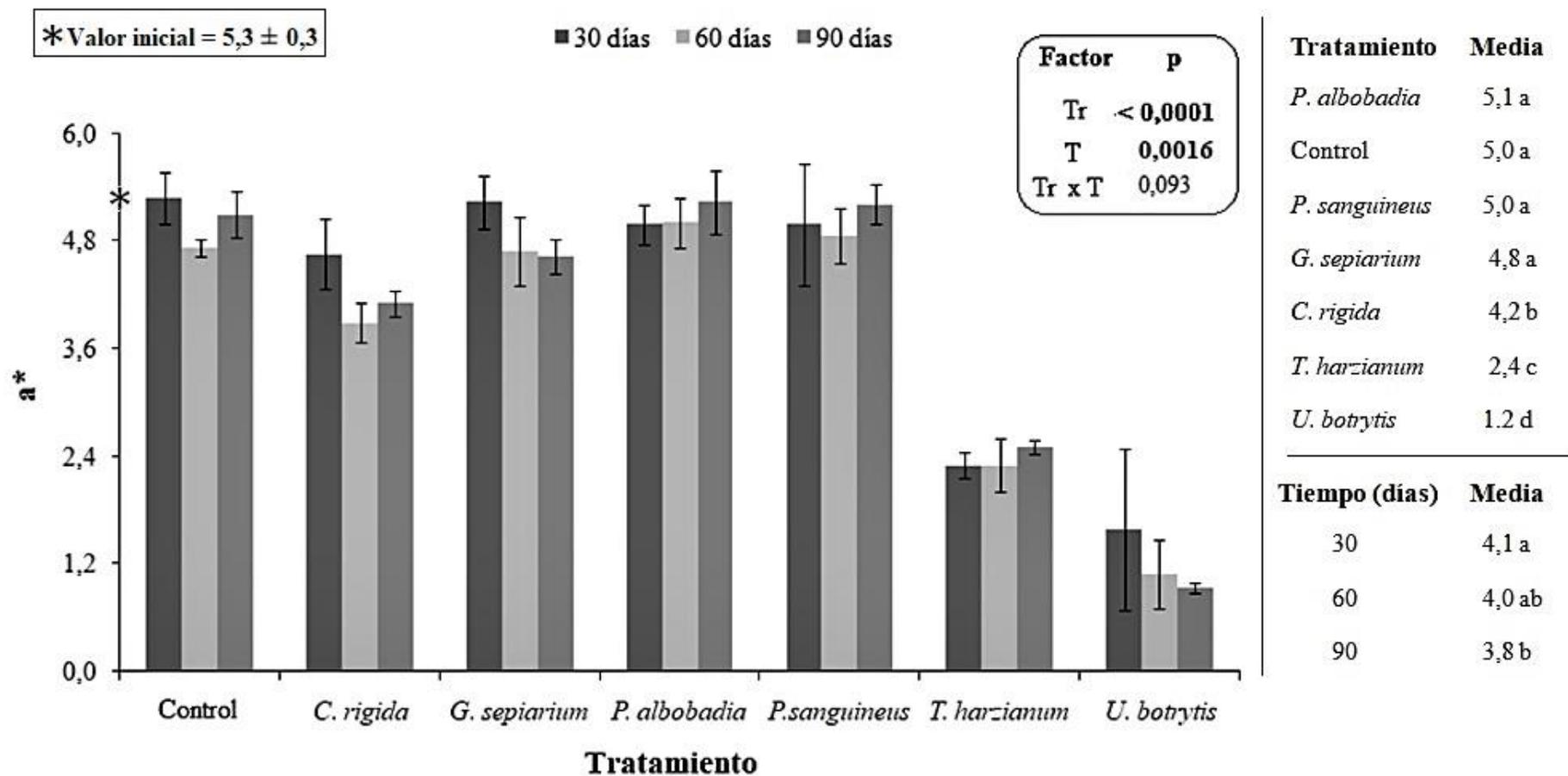


Fig. III.10 - Componente a^* del color de la FS del orujo control y tratado con los hongos saprófitos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

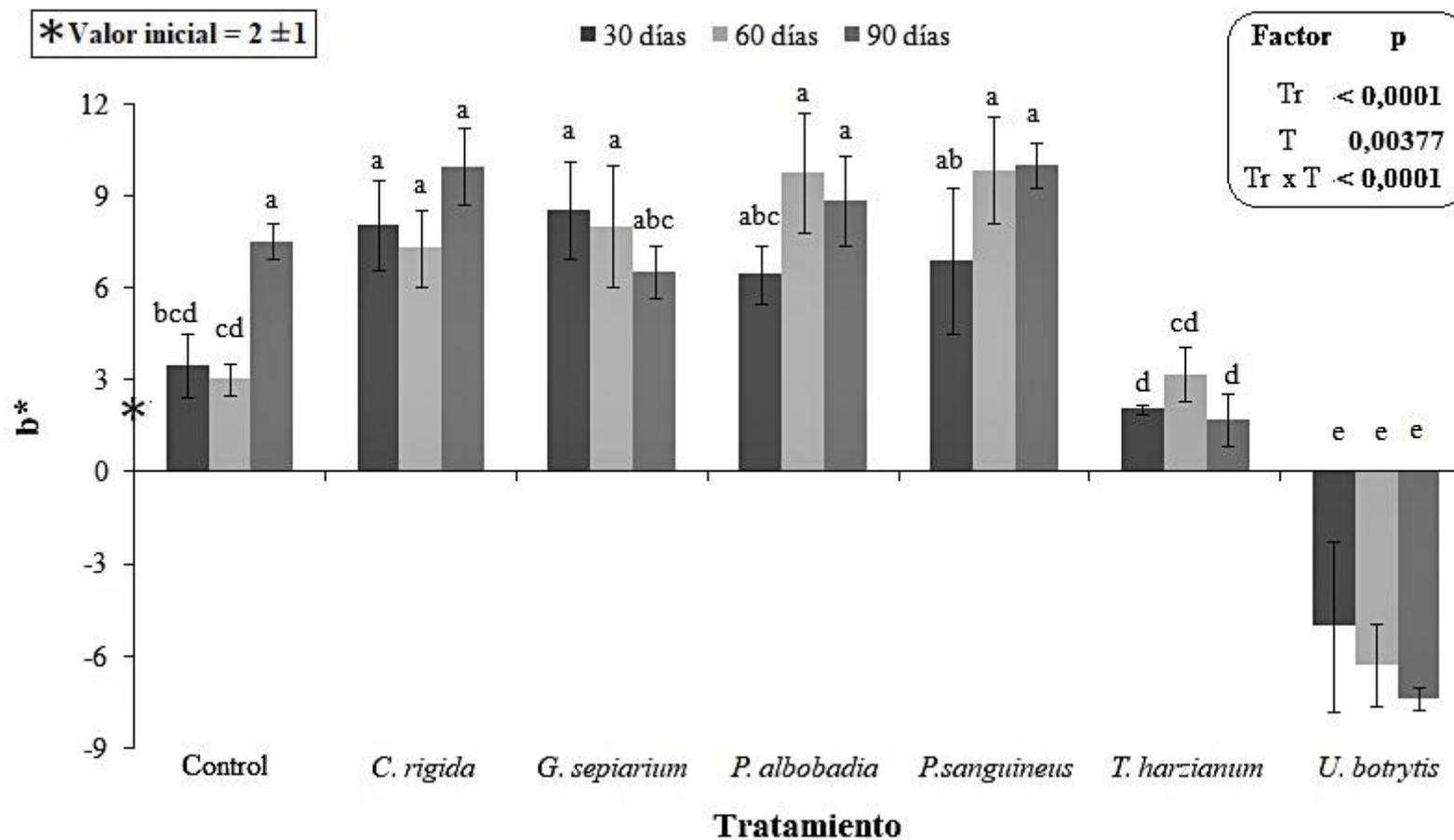


Fig. III.11 - Componente b* del color de la FS del orujo de uva control y tratado con los hongos saprótrofos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, p<0,05).

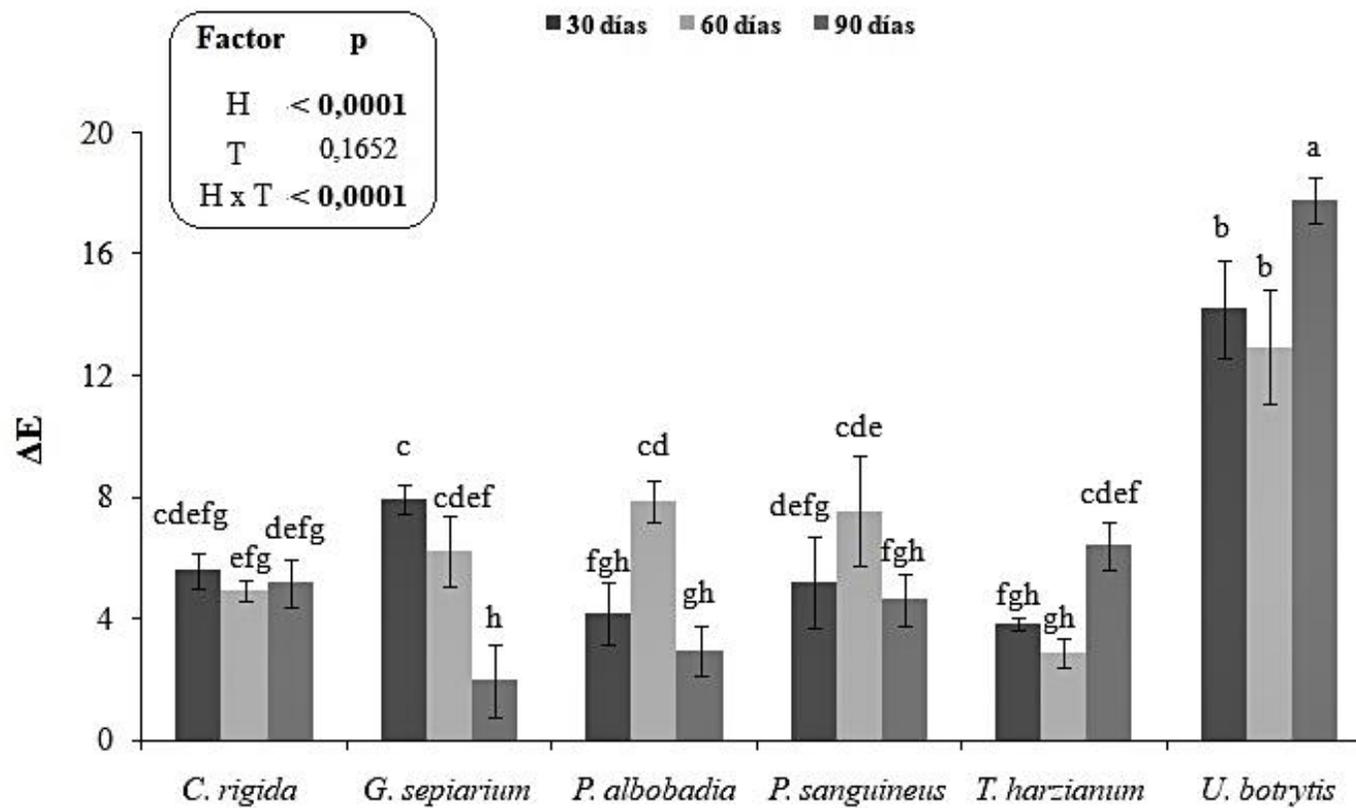


Fig. III.12 - Cambio de color (ΔE) en la FS del orujo de uva después del tratamiento con los hongos saprótrofos (H) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

Los espectros FT-Raman del orujo de uva control (sin tratar) y los tratados con los distintos hongos saprótrofos a los 90 días de incubación se muestran en la Fig. III.13. Al comparar los espectros, se observaron variaciones en la intensidad (I) de las absorbancias a 1096 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} y 1739 cm^{-1} atribuidos a celulosa, lignina y hemicelulosa, respectivamente, polímeros que forman parte de en la pared de la célula vegetal. Los cambios relativos en las relaciones de las bandas de carbohidratos y lignina se muestran en la tabla III.2. El valor de la relación $I. 1600\text{ cm}^{-1} / I 1739\text{ cm}^{-1}$ se redujo después del tratamiento del orujo con *P. albobadia*, *P. sanguineus* y *T. harzianum*, respecto al control; siendo este primer hongo el que provocó la mayor reducción. En la relación $I. 1600\text{ cm}^{-1} / I 1096\text{ cm}^{-1}$, entre las diferencias encontradas en los valores obtenidos se destacó el aumento de la relación en *G. sepiarium* y la reducción en *U. botrytis*, respecto del control. En cuanto a la relación $I 1739\text{ cm}^{-1} / I 1096\text{ cm}^{-1}$, se observó un aumento y una reducción significativa en los valores obtenidos para *P. sanguineus* y *U. botrytis*, respectivamente.

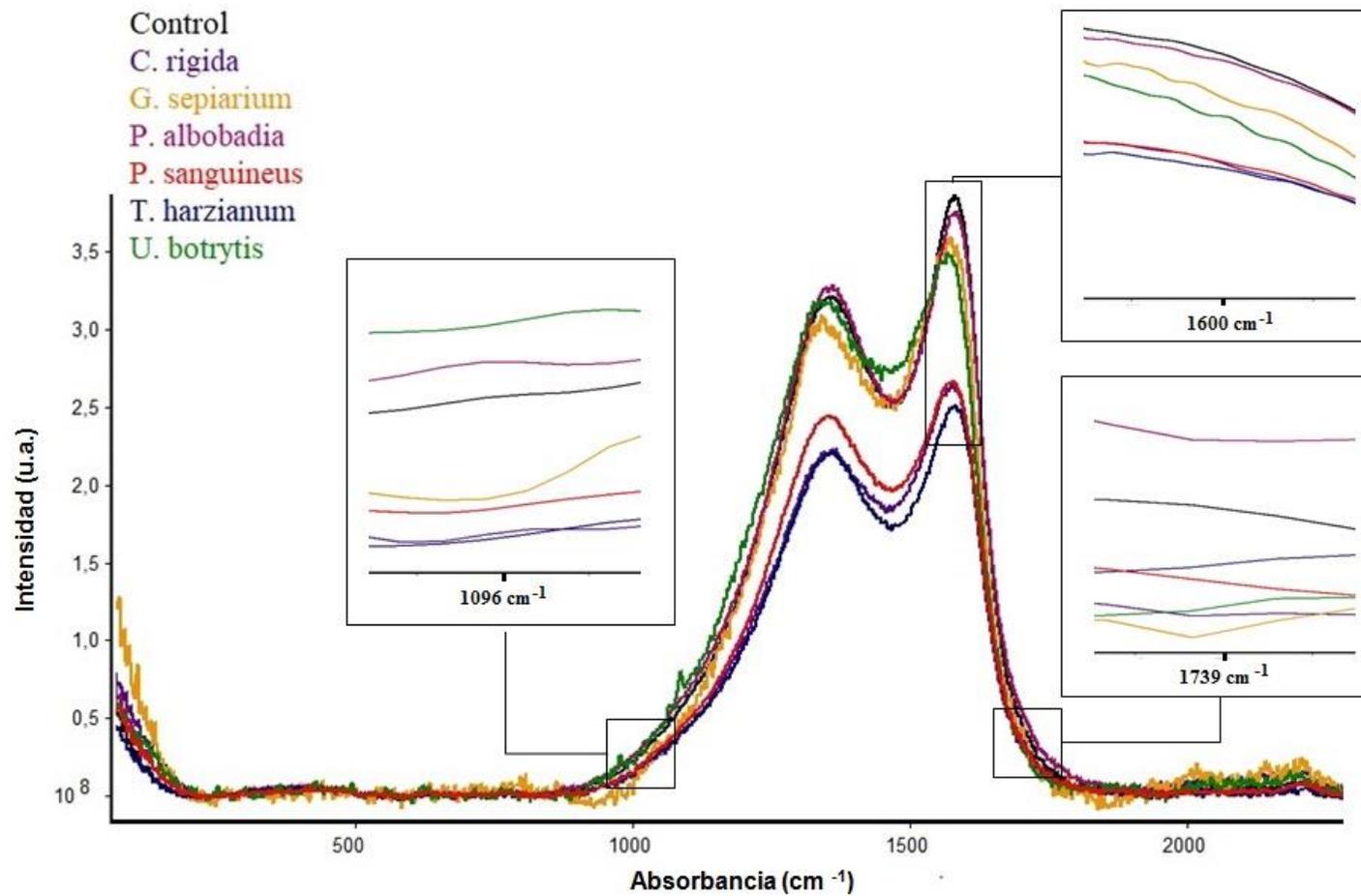


Fig. III.13 - Espectros FT-Raman de las muestras de la FS del orujo de uva control y tratados con los hongos saprótrofos después de 90 días de incubación. Cada espectro corresponde al valor medio obtenido de 4 réplicas.

Tabla III.2-Cambio relativo en las relaciones I.1600 cm⁻¹/ I.1735 cm⁻¹, I.1600 cm⁻¹/ I.1096 cm⁻¹ y I.1735 cm⁻¹/ I.1096 cm⁻¹ de los espectros Raman de la FS del orujo de uva control y tratado con los distintos hongos a los 90 días de incubación.

Tratamiento	I.1600 cm ⁻¹ / I.1735 cm ⁻¹	I.1600 cm ⁻¹ / I.1096 cm ⁻¹	I.1735 cm ⁻¹ / I.1096 cm ⁻¹
Control	24,9 ± 4,4 a	5,5 ± 0,6 bc	0,27 ± 0,03 bc
<i>C. rigida</i>	17,2 ± 4,3 abc	7,1 ± 1,6 ab	0,23 ± 0,06 cd
<i>G. sepiarium</i>	20,8 ± 6,7 ab	8,7 ± 2,3 a	0,26 ± 0,06 bc
<i>P. albobadia</i>	11,8 ± 2,3 c	5,3 ± 1,2 bc	0,38 ± 0,07 ab
<i>P. sanguineus</i>	14,9 ± 3,6 bc	5,8 ± 0,5 ab	0,40 ± 0,08 a
<i>T. harzianum</i>	14,7 ± 2,5 bc	6,2 ± 0,9 ab	0,35 ± 0,03 abc
<i>U. botrytis</i>	20,9 ± 7,2 ab	3,7 ± 0,2 c	0,11 ± 0,05 d

Media y desvío de cuatro réplicas. Para cada columna, letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, p<0,05).

Diferentes parámetros físico-químicos se analizaron sobre alícuotas de la FSA_{bh} del orujo en ausencia y presencia de los hongos e incubados por 90 días a 28 °C. El contenido de azúcares reductores, NH₄⁺-N y la Abs. a 395 fueron los parámetros más afectados respecto a los niveles obtenidos al tiempo inicial en el control sin el agregado de hongos (ANEXO I, Tabla A1). Se encontraron diferencias en los niveles de azúcares reductores con los tratamientos realizados con algunos de los hongos (Fig. 13). Mientras que *P. albobadia* generó una reducción del 31,9 ± 4,4; 54,4 ± 2,6 y 59,8 ± 3,2 % en el contenido relativo de azúcares reductores a los 30, 60 y 90 días de incubación; *C. rigida* y *T. harzianum* sólo causaron una disminución en las muestras después de los 60 días de incubación. Los niveles disponibles de NH₄⁺-N en la FSA_{bh} mostraron variaciones en los orujos expuestos a los hongos, aunque el efecto de cada hongo fue diferente y además estuvo en función del tiempo de incubación (Fig. III.14). *C. rigida*, *P. sanguineus*, *T. harzianum* y *U. botrytis* redujeron el nivel de NH₄⁺-N a los 30 días de incubación y posteriormente incrementaron la disponibilidad del mismo en la FSA_{bh} cuando la incubación se extendió hasta los 90 días, excepto el orujo tratado con *U. botrytis*. Mientras que *G. sepiarium* y *P. albobadia* incrementaron los niveles de NH₄⁺-N en los 3 tiempos de incubación, aunque *P. albobadia* demostró tener un efecto mineralizante superior a *G. sepiarium*. Excepto cuando el orujo se inoculó con *G. sepiarium*, en el resto de los tratamientos, los hongos provocaron una reducción en el contenido de fenoles solubles a los 30, 60 y 90 días de incubación (Fig. III.15). Este efecto de defenolización fue más notorio a los 30 días de incubación, siendo los hongos *C. rigida* y *P. albobadia* los que provocaron la mayor reducción (70,0 ± 4,0 y 80,8 ± 2,2 %, respectivamente). No obstante, no se encontraron diferencias a lo largo del tiempo de incubación en los niveles de fenoles libres correspondientes al orujo tratado con *C. rigida*, *P. albobadia* y *T. harzianum*. En cambio el efecto defenolizante causado por *P. sanguineus* y *U. botrytis* varió en relación al tiempo de incubación, los que mostraron un patrón opuesto al compararlos entre sí. Con relación al pH de la FSA_{bh}, el tratamiento del orujo con *C. rigida*, *G. sepiarium*, *T. harzianum* y *U. botrytis* provocaron incrementos en el pH a lo largo del periodo de incubación analizado, siendo este efecto más notorio a los 60 días de incubación del orujo inoculado (Fig. III.16). No obstante, los 3 hongos restantes produjeron incrementos leves a los 90 días de incubación. Al evaluar el contenido de cromóforos en la FSA_{bh} de los orujos tratados con los hongos, sólo el orujo inoculado con *U. botrytis* presentó un marcado aumento del valor de

absorbancia a 395 nm, el cual incluso se intensificó después de los 60 días de incubación (Fig. III.17). Adicionalmente en el mismo tiempo de incubación se detectó un leve aumento relativo en el contenido de cromóforos en la FSA_{bh} en el orujo inoculado con *G. sepiarium*.

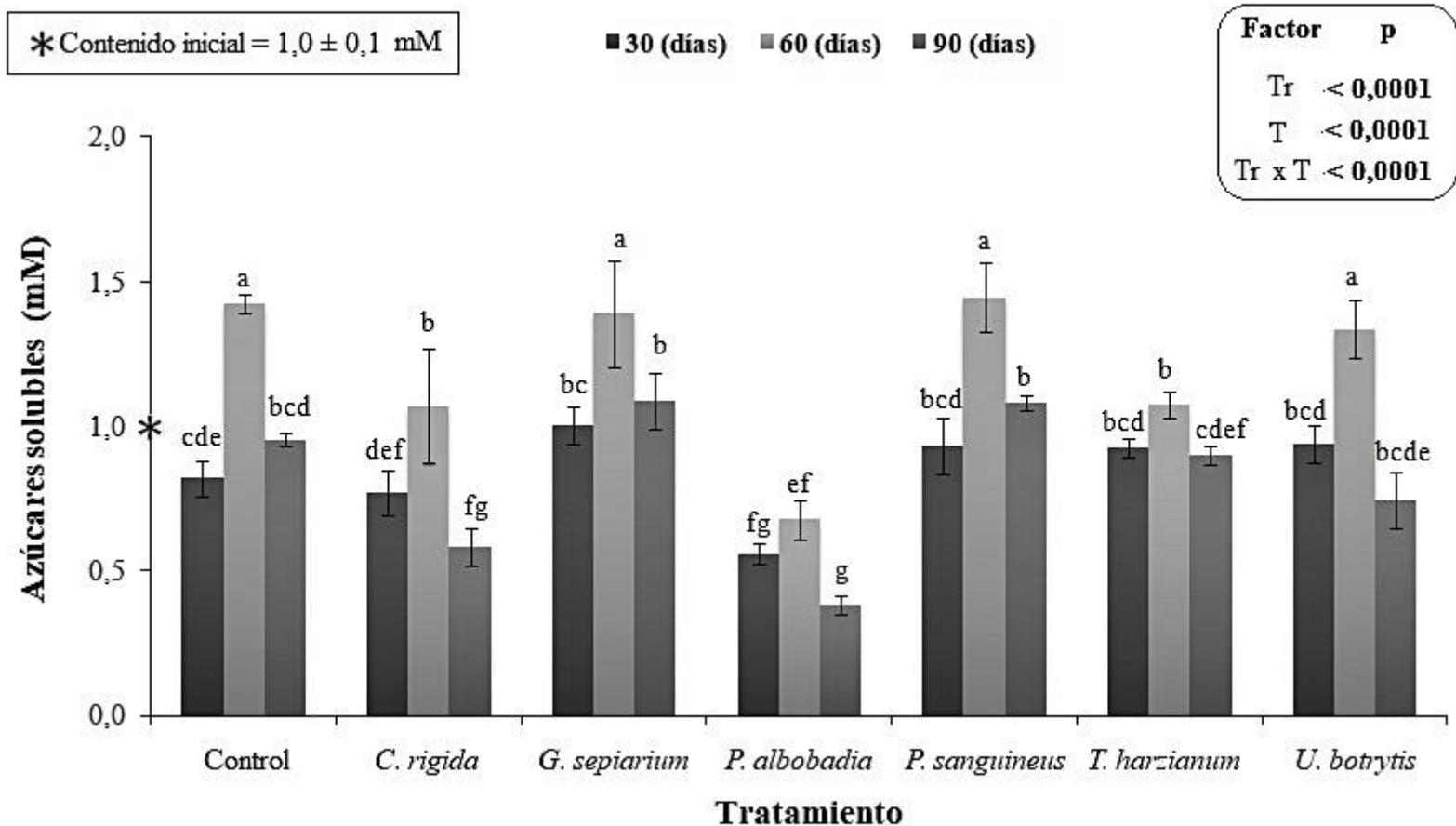


Fig. III.14 – Contenido de azúcares reductores en la FSA del orujo de uva control y tratado con los hongos saprófitos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

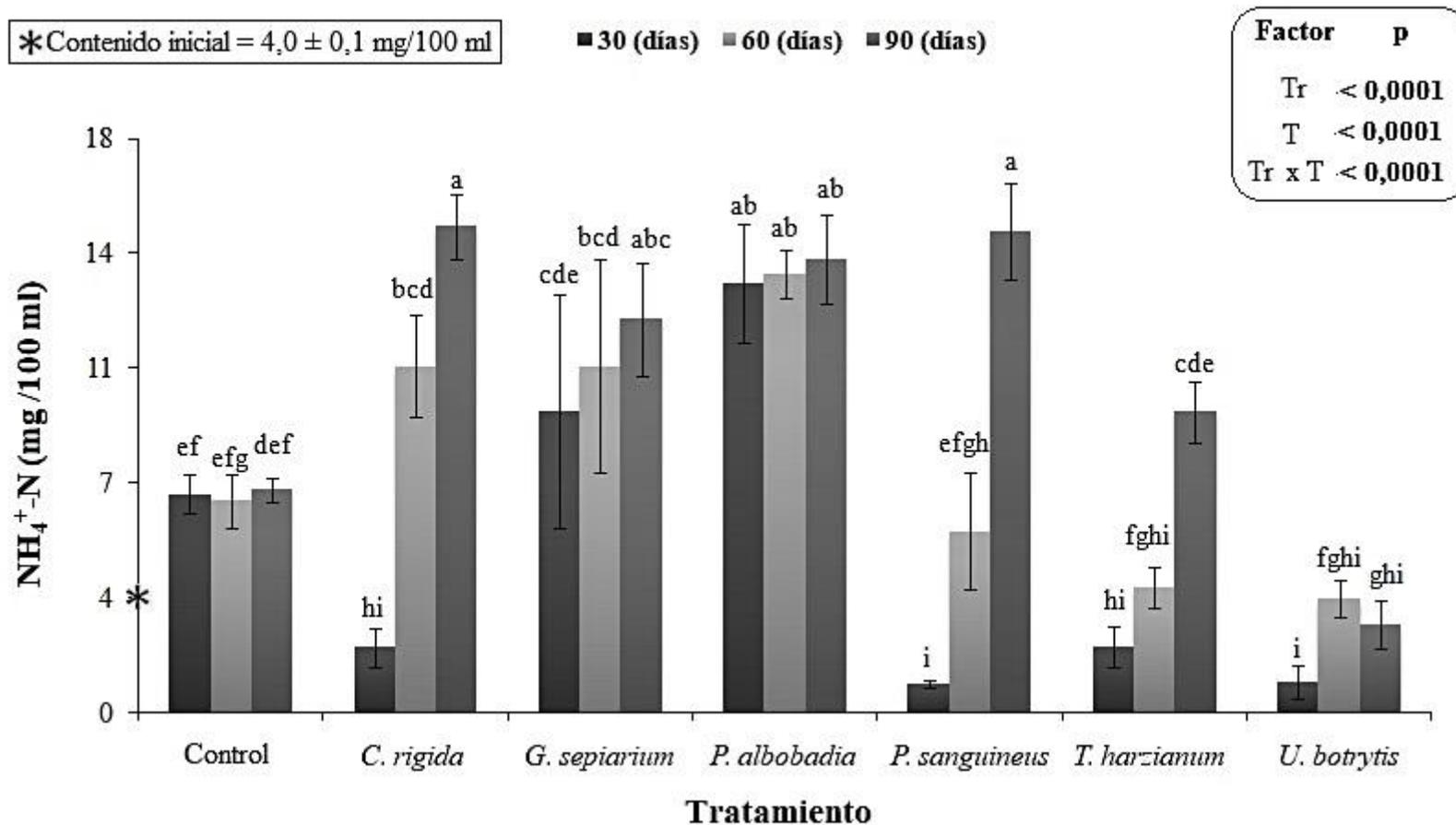
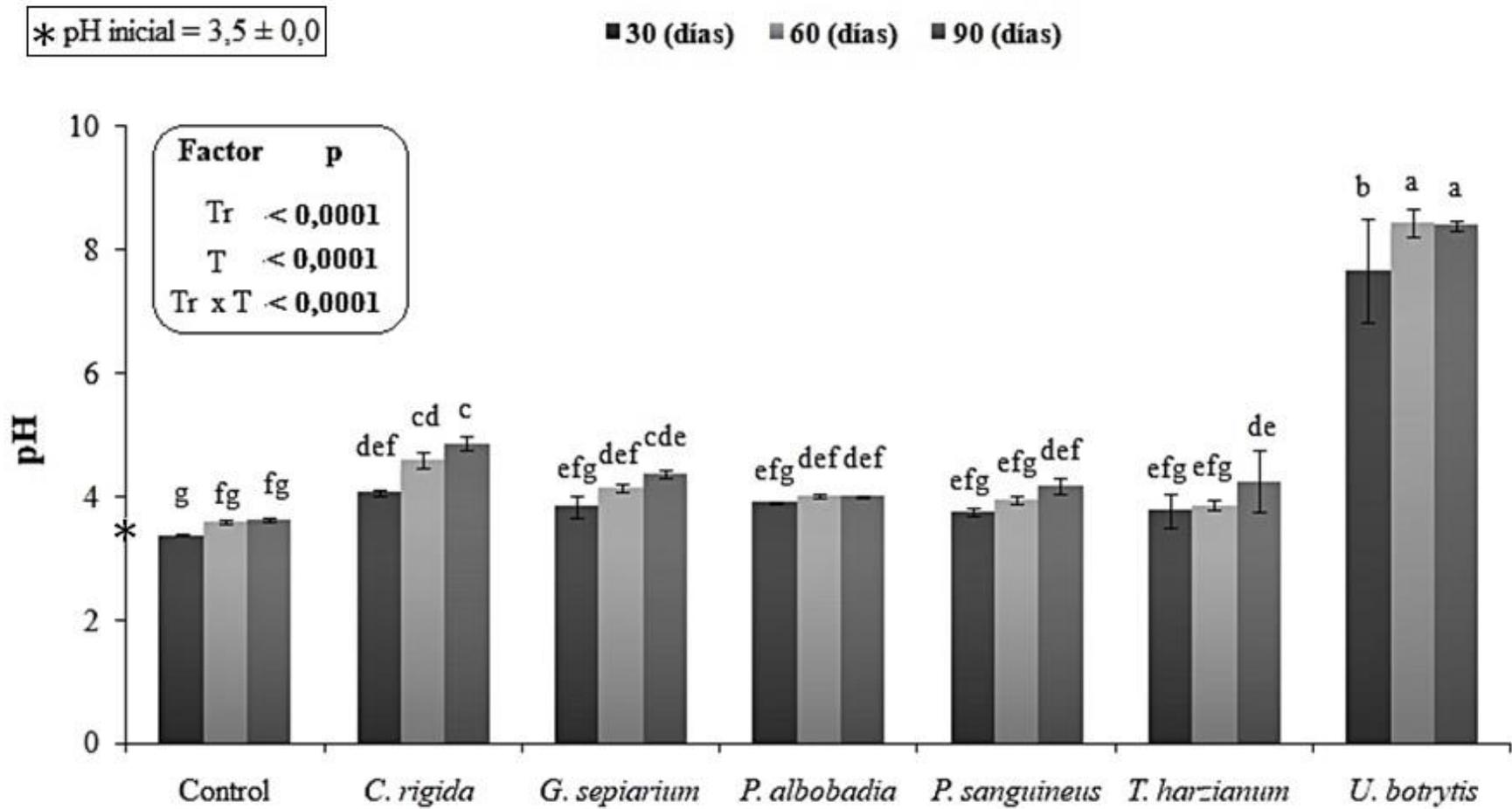


Fig. III.15- Contenido de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en la FSA del orujo de uva control y tratado con los hongos saprófitos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).



III.16 - Valor de pH en la FSA del orujo de uva control y tratado con los hongos saprófitos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

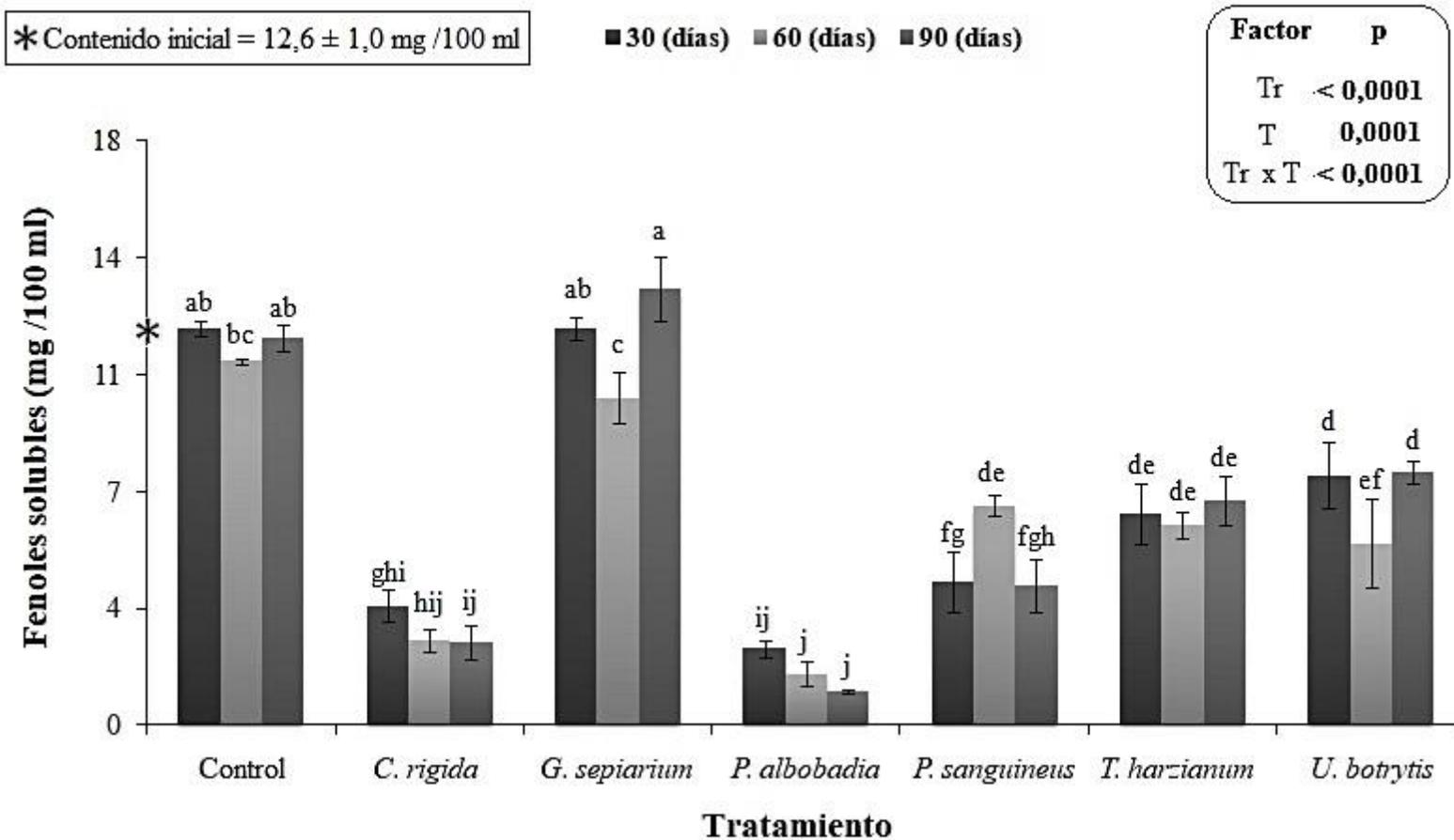


Fig. III.17 - Contenido de fenoles solubles en la FSA del orujo de uva control y tratado con los hongos saprótrofos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

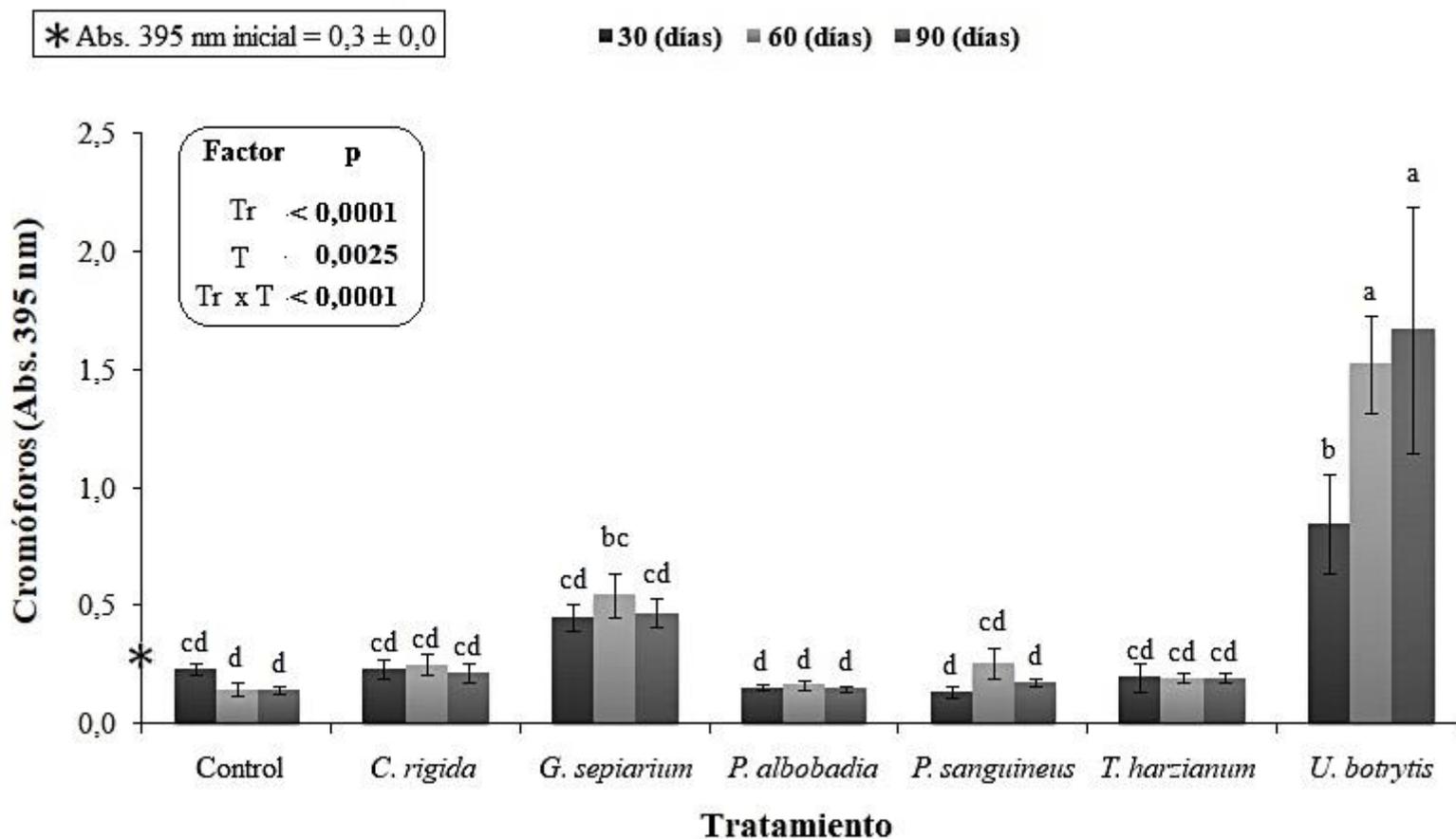


Fig. III.18 – Contenido de cromóforos detectados en la FSA del orujo de uva control y tratado con los hongos saprótrofos (Tr) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior izquierdo se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

En las FSA_{bh} también se evaluó la presencia de enzimas hidrolíticas y oxidativas ya que las mismas podrían estar involucradas en la transformación del orujo que realizan los hongos incluidos en este estudio. Se detectó actividad β -1-4-endoglucanasa y β -1-4-endoxilanasas en la FSA_{bh} de todos los hongos evaluados, cuyos niveles variaron en función del tipo de aislamiento fúngico empleado y dentro del tiempo de incubación estudiado (Fig. III.18-19). Los máximos niveles de actividad β -1-4-endoglucanasa se detectaron en la mayoría de los orujos inoculados a los 30 días de incubación, siendo el máximo valor de actividad detectado en la FSA proveniente del orujo inoculado con *G. sepiarium* ($314,3 \pm 100,8$ mU/ml) (Fig. III.18). Con el incremento del tiempo de incubación, la actividad entre los distintos hongos se equiparó. Las diferencias detectadas en los niveles de actividad β -1-4-endoxilanasas se debieron al efecto de la interacción especie fúngica inoculada y los tiempos de cultivo evaluados (Fig. III.19). La incubación del orujo con *C. rigida* mostró el mayor nivel enzimático a los 60 días de incubación ($164,0 \pm 32,7$ mU/ml). A diferencia del resto de los hongos, los niveles de actividad β -1-4-endoxilanasas detectados en los orujos inoculados con *G. sepiarium* y *P. sanguineus* se mantuvieron relativamente constantes durante el proceso de incubación. Con respecto a la actividad oxidativa, la actividad lacasa fue detectada únicamente en las FSAs de los orujos de uva inoculados con *C. rigida*, *P. albobadia* y *P. sanguineus*. La variación en los niveles de actividad lacasa encontrados estuvo relacionada con el tiempo de incubación y la especie fúngica empleada (Fig. III.20). Durante los primeros 30 días de incubación se detectaron niveles de actividad más altos en los orujos inoculados con *C. rigida* y *P. sanguineus*, el orujo tratado con este último hongo fue el que mostró el máximo nivel ($23,6 \pm 5,2$ mU/ml). En la FSA del orujo tratado con *P. albobadia*, los niveles de actividad lacasa encontrados a lo largo del proceso de incubación fueron relativamente constantes. No se detectó actividad peroxidasa en ninguna de las FSAs al menos en las condiciones estudiadas.

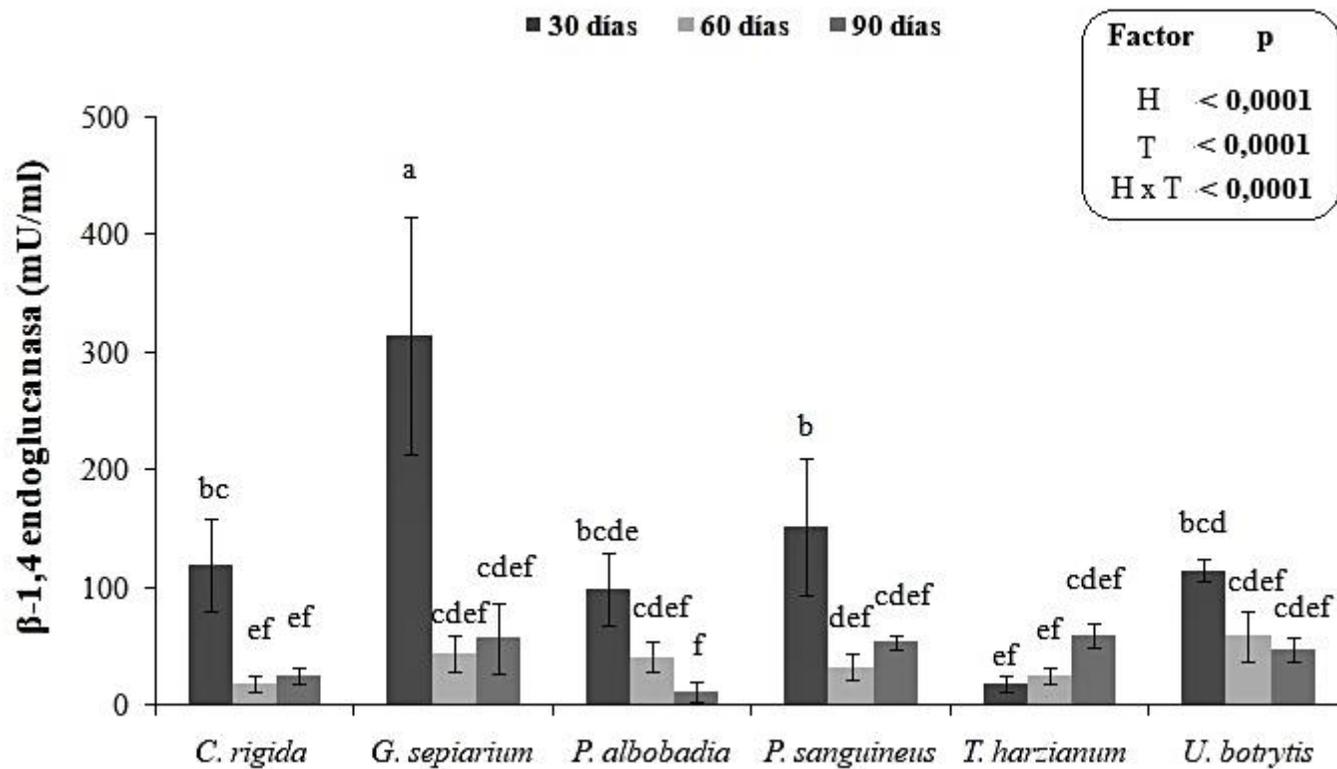


Fig. III.18 – Actividad β -1,4 endoglucanasa detectada en la FSA del orujo de uva tratado con los hongos saprótrofos (H) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

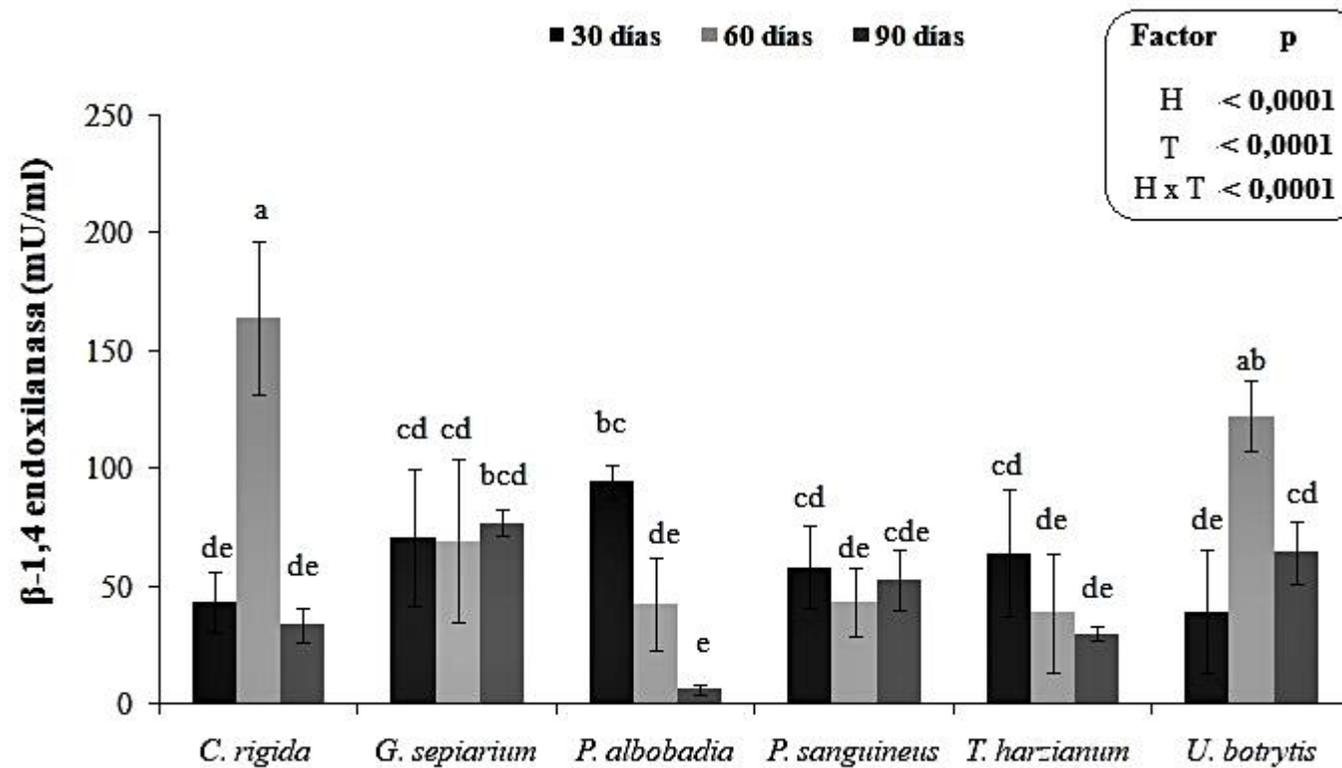


Fig. III.19 – Actividad β -1,4 endoxilanasas detectada en la FSA del orujo de uva tratado con los hongos saprótrofos (H) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negrita los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

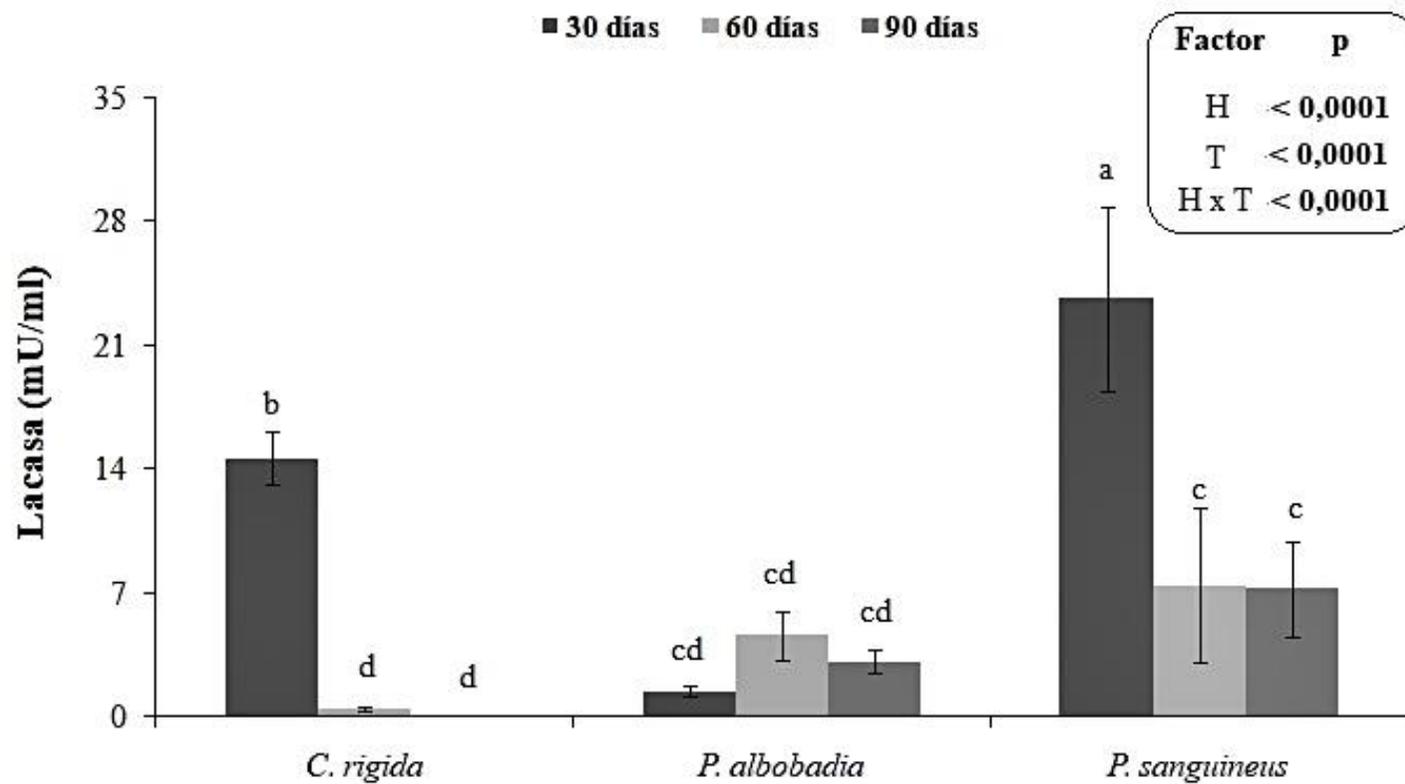


Fig. III.20 – Actividad lacasa detectada en la FSA del orujo de uva tratado con hongos saprófitos (H) a distintos tiempos de incubación (T; 30, 60 y 90 días). Media y desvío de cuatro réplicas. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA, resaltados en negra los factores estadísticamente significativos. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, $p < 0,05$).

II.4- DISCUSIÓN

En los suelos de los ambientes naturales los hongos saprótrofos son los principales agentes transformadores de la materia orgánica, ya que poseen o emplean diferentes estrategias para colonizar y tener ventajas competitivas con otros microorganismos con el fin de acceder rápidamente a los nutrientes presentes en el mismo (Cooke & Whipps, 1993). Diferentes reportes avalan que en cultivos bajo FES en ausencia de competencia interespecífica, la eficiencia de degradación de los hongos depende del desempeño de las enzimas que son capaces de producir en relación a la composición química del sustrato y las condiciones del cultivo (Edman et al., 2006). Esto explicaría las diferencias encontradas en la reducción del peso del orujo de uva causada por el tratamiento con los hongos. Existen hongos que en sustratos pobres de nutrientes o recalcitrantes a la degradación mantienen altas tasas reproductivas lo que les permite explorar y colonizar el ambiente más rápidamente, denominados estrategias “r” (Pugh, 1980). El orujo de uva es un sustrato recalcitrante (contenido de lignina > 20 %; Saparrat et al., 2008b), por lo cual este tipo de estrategia reproductiva podría explicar la mayor eficiencia de degradación causada por *U. botrytis*, aún cuando en los primeros 30 días presentó el menor porcentaje de reducción de peso del orujo.

El color es uno de los parámetros empleados para evaluar la transformación de sustratos sólidos o efluentes líquidos por la acción de los hongos (Dorado et al., 1999; Jaouani et al., 2003; Aloui et al., 2007; Okino et al., 2009). En relación a los parámetros del sistema CIELAB, el incremento encontrado en la luminosidad del orujo tratado con *G. sepiarium* a los 30 días de cultivo se contrapone con lo reportado para el cultivo de *Gloeophyllum striatum*, otro hongo de pudrición castaña, sobre madera de clones de caucho y ciprés (Okino et al., 2009). Bajo este tipo de pudrición, es de esperar que la degradación fúngica de un sustrato lignocelulósico se oscurezca al quedar la lignina expuesta por la remoción los polisacáridos de la pared. En hongos de pudrición blanca, en cambio, un incremento en la luminosidad indicaría el accionar de las enzimas oxidativas sobre la lignina; tal como se reportó sobre el alpeorujo tratado con *C. rigida* después de 5 meses de incubación (Sampedro Quesada, 2005). *C. rigida* y los otros dos hongos de pudrición blanca, *P. albobadia* y *P. sanguineus*, no provocaron cambios en la luminosidad del orujo, lo cual podría indicar que no hubo remoción de este polímero recalcitrante o que el tiempo de incubación no fue suficiente para poder evidenciar tal efecto. Entre las intensidades de color determinadas en el orujo, el rango de amarillo-

azul (b^*) fue el más afectado por los hongos, de los cuales sólo los hongos de pudrición evidenciaron un incremento en tal valor. Se ha reportado la variación hacia el rango del amarillo en el material degradado por la acción fúngica como resultado de la presencia de cromóforos (Okino et al., 2009). En el caso de *U. botrytis*, la disminución en la intensidad de color en este rango, así como, la pérdida de luminosidad en el orujo, podría ser causada por la inmovilización de cromóforos en la matriz miceliar o esporas por grupos secuestrantes como las melaninas enmascarando el proceso de degradación (Llorente et al., 2012). En base al sistema de clasificación de la percepción del color en relación al ΔE^* propuesto por Cui et al. (2004) (0-0,5, despreciable; 0,5-1,5, ligeramente perceptible; 1,5-3, perceptible; 3-6, apreciable y de 6-12 notoriamente apreciable), los resultados obtenidos muestran que hay alteraciones perceptibles a notoriamente perceptibles en el orujo, aunque ello es dependiente del tiempo de cultivo y el hongo inoculado, confirmando el accionar de los hongos sobre el sustrato.

La espectroscopía FT-Raman es una herramienta novedosa para caracterizar sustratos lignocelulósicos y analizar cambios en su composición química por el tratamiento con agentes físico-químicos y biológicos (Heredia-Guerrero et al., 2014; Durmaz et al., 2016; Özgenç et al., 2017). La actividad fúngica sobre la matriz polimérica del orujo de uva ha sido evaluada empleando un análisis semi-cuantitativo sobre los datos de intensidad Raman colectados para absorbancias asociadas a grupos funcionales correspondientes a la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La reducción en la relación $I_{1600} \text{ cm}^{-1} / I_{1735} \text{ cm}^{-1}$ en el orujo tratado con *P. albobadia*, *P. sanguineus* y *T. harzianum* comparado al grupo control sugiere un incremento en el contenido de hemicelulosa respecto al control, lo que se debería a una remoción de la lignina mediante una despolimerización oxidativa por parte de los hongos. Estudios previos han demostrado que *P. albobadia* y *P. sanguineus* tienen actividad ligninolítica cuando se incuban en un amplio espectro de compuestos aromáticos sobre medios agarizados, sustratos lignocelulósicos bajo FES y cultivos sumergidos (Saparrat et al., 2000, 2002; Vikineswary et al., 2006; Jurado et al., 2009); en cambio para *T. harzianum* su estudio fue acotado a únicamente cultivos sumergidos (Hölker et al., 2002; Asemoloye et al., 2018). Respecto a la relación $I_{1600} \text{ cm}^{-1} / I_{1096} \text{ cm}^{-1}$, *G. sepiarium* mostró una marcada habilidad celulolítica, lo cual coincide con el patrón de pudrición castaña reportado para este aislamiento sobre madera de acacia blanca (*Robinia pseudoacacia* L.), acacia negra (*Gleditsia triacanthos* L.) y pino (*Pinus ponderosa* Dougl. ex. Laws)

(Murace et al., 2010, 2014). Un resultado similar se reportó para el hongo de pudrición castaña *Coniophora puteana* durante la degradación de la madera de abeto (Durmaz et al., 2016). Por otro lado, el incremento en la relación $I.1735 \text{ cm}^{-1} / I.1096 \text{ cm}^{-1}$ para *P. albobadia* y *P. sanguineus* sobre orujo de uva sugiere un patrón de degradación simultaneo, lo cual se contraponen al patrón de degradación selectivo que presenta *P. sanguineus* LPSC 163 sobre madera de álamo (Luna et al., 2004). Cambios en el patrón de degradación de selectivo a simultaneo también han sido reportados para *Ganoderma australe* y *Trametes versicolor* cultivados sobre madera de pino (*P. radiata*) y tallos de bambú (*Phyllostachys pubescence*), respectivamente, con el incremento del tiempo de incubación (Ferraz et al., 2000; Zhang et al., 2007).

El proceso de transformación del orujo de uva por el tratamiento con los hongos bajo estudio también ha sido evaluado a través del análisis del grado de alteración físico-química que presenta su FSA y los mecanismos enzimáticos fúngicos involucrados durante el mismo. Entre los nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano, los azúcares solubles son una de las principales fuentes carbonadas que los hongos utilizan debido a su facilidad de asimilación (Cooke & Whipps, 1993). En cultivos de *Pleurotus eryngii* y *P. radiata* sobre paja de trigo, se ha observado una reducción en el contenido de azúcares durante la fase activa de crecimiento en relación a su demanda de consumo y una posterior acumulación hacia etapas finales del periodo de incubación, lo que indicaría un descenso de la actividad metabólica de estos hongos (Dorado et al., 1999). La reducción observada en el contenido de azúcares en los cultivos de orujo con *C. rigida* y *P. albobadia* a los 60 y 90 días de incubación respecto a su control abiótico indicaría que ambos hongos aún se encuentran en tropofase. Si bien los niveles de azúcares en la FSA del orujo transformado con *G. sepiarum*, *P. sanguineus*, *T. harzianum* y *U. botrytis* son similares a los controles abióticos, esto podría ser el resultado neto entre el pool de azúcares resultantes de procesos abióticos y el aporte de monosacáridos liberados de la degradación fúngica de los polímeros del orujo y la velocidad de absorción de estos azúcares por el hongo presente en función a su requerimiento nutricional. Durante el ataque fúngico a las paredes celulares del sustrato, diferentes proteínas podrían ser hidrolizadas a sus aminoácidos y su posterior desaminación liberando formas nitrogenadas inorgánicas a la FSA, tal como el $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ (Dorado et al., 1999). Esto explicaría el incremento encontrado en los niveles de este compuesto inorgánico en la FSA del orujo en la mayoría de los orujos transformados

por los hongos. No obstante, durante la incubación también se detectó una reducción de $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$ lo cual podría estar relacionado a su consumo y consecuente inmovilización en la biomasa fúngica (Dorado et al., 1999; Saparrat et al., 2010). Generalmente los hongos son conocidos por llevar a cabo sus actividades metabólicas a pH ácidos (López et al., 2002). Excepto *U. botrytis*, la mayoría de los hongos cultivados sobre el orujo incrementaron levemente el valor de pH de la FSA sugiriendo una estrecha relación entre los sistemas enzimáticos y su crecimiento bajo pH ácidos ($\text{pH} < 6$). Estos incrementos en el pH podrían deberse a la liberación de iones $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$ como un resultado del metabolismo fúngico o así como a la aparición de otros subproductos de la degradación y metabolitos fúngicos sintetizados durante el periodo de incubación (Saparrat et al., 2007, 2010; Vylkova, 2017). El aumento en el contenido de $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$ sostendría el efecto detectado sobre el pH de la FSA de la mayoría de los orujos transformados por los hongos. No obstante, la alcalinización de la FSA causada por el cultivo del orujo con *U. botrytis* no tuvo relación a un incremento de $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$, cuya actividad metabólica parece diferir notoriamente del resto de los hongos. Reportes previos indican que *U. botrytis* LPSC 813 presenta un sistema enzimático hidrolítico cuya actividad es óptima en el rango entre 7-8 de pH, lo cual podría estar vinculado a la alcalinidad propia del sustrato de aislamiento (hojarasca de *Scutia buxifolia*) (Saparrat et al., 2007, 2008b). Sin embargo, puesto que este hongo redujo el contenido de $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$ durante el proceso de transformación, otros agentes alcalinizantes parecerían estar involucrados en el proceso, aunque es necesario disponer de más información para corroborar tal hipótesis. En hongos patógenos se ha reportado que la alcalinización del medio favorece la germinación, el crecimiento de las hifas y la formación de cuerpos fructíferos y por ende la liberación de esporas favoreciendo la virulencia y la evasión de respuestas inmunitarias (Vylkova, 2017). Es conocido que los compuestos fenólicos presentes en residuos lignocelulósicos, como el orujo de uva, inhiben a la comunidad descomponedora del suelo y afectan la sanidad de los cultivos; por lo cual su remoción es un factor clave para acelerar la degradación y la reducción de la fitotoxicidad en estos tipos de sustratos (Aranda et al., 2006). Los hongos redujeron el contenido de fenoles del orujo, a excepción de *G. sepiarium*, esto podría deberse al empleo de diferentes mecanismos para afrontar los tenores fenólicos propios del sustrato o los generados durante el proceso de degradación. Reportes previos destacan la eficiencia de las lacasas producidas por los hongos de pudrición blanca (HPB) para la remoción de fenoles, dentro de los cuales se destaca la participación de *C. rigida* y *P. sanguineus*; lo cual a su

vez concordaría con los resultados obtenidos (Jurado et al., 2009; Saparrat et al., 2010). En el caso de la alta eficiencia de *P. albobadia* en la reducción de fenoles en el orujo, no hay aún información que permita relacionar ambos procesos si bien se destaca que su capacidad de producir lacasas bajo cultivo sumergido ya ha sido descrita (Saparrat et al., 2000, 2002). Ciertos hongos tienen la capacidad de degradar ciertos fenoles y no otros (Sampedro et al., 2004), lo cual podría explicar la remoción parcial obtenida en las FSA del orujo de uva tratado con *T. harzianum* y *U. botrytis* comparado con lo observado con los HPB. En el caso de estos dos hongos se ha demostrado su capacidad para producir enzimas de naturaleza oxidativa, sin embargo, sólo para *U. botrytis* se ha establecido su relación con la remoción de compuestos fenólicos (Guiraud et al., 1995; Hölker et al., 2002; Asemoloye et al., 2018). Por otro lado, la adsorción de fenoles por la biomasa fúngica podría también explicar la reducción del contenido de fenoles, tal como ha sido reportado para *Aspergillus niger*, *Funalia trogii* y *Schizophyllum commune* al emplear el pellet del hongo libre o el mismo inmovilizado en una matriz sólida (Rao & Viraraghavan, 2002; Bayramoglu et al., 2009; Kumar & Min, 2011). Alternativamente, la degradación estaría vinculada a la relación entre pH y los compuestos fenólicos libres, a pH neutro o ligeramente alcalino los fenoles pasan a fenatos perdiendo así su poder antimicrobiano (Sampedro Quesada, 2005). Esto podría vincular la reducción de fenoles y la alcalinización detectada de la FSA del orujo de uva tratado con *U. botrytis*, aunque tampoco se podría descartar los otros mecanismos mencionados. La medición de la absorbancia a 395 nm en la FSA del orujo tratado con los hongos reveló únicamente para *U. botrytis* un fuerte incremento en el contenido de cromóforos, estos pigmentos solubles podrían ser producto de la actividad del hongo sobre el sustrato coincidiendo potencialmente con la reducción del contenido de fenoles libres detectados en la FSA o la producción de moléculas precursoras de compuestos insolubles como las melaninas, así como también, su posterior oxidación a compuestos similares a los ácidos húmicos presentes en los suelos (Almendros et al., 1985; Guiraud et al., 1995). Dorado et al. (1999) reportó el incremento de cromóforos en la FSA de paja de trigo cultivada con *P. eryngii* con el incremento del tiempo de incubación. Otros estudios indican que la remoción de fenoles libres por la acción fúngica no necesariamente tiene una relación con la presencia de compuestos aromáticos coloreados (Sampedro Quesada, 2005).

La capacidad de los hongos para hidrolizar polisacáridos contenidos en el orujo de uva ha sido confirmada al detectar la presencia de β -1,4 endoglucanasa y β -1,4 endoxilanasas. Las variaciones en los niveles de actividad detectados dependerían de la eficiencia de cada hongo para depolimerizar los polisacáridos de la pared celular vegetal durante su crecimiento, lo cual concordaría con los resultados obtenidos en el contenido de azúcares solubles y los cambios relativos en las relaciones lignina/celulosa y hemicelulosa/celulosa de los espectros Raman de la FSA y FS del orujo tratado con los hongos, respectivamente. Resultados similares se han reportado durante el cultivo de diferentes hongos sobre un mismo sustrato, tales como el raspón de los racimos de uva, el alperujo y los residuos de la post cosecha de la caña de azúcar (Sampedro et al., 2005; Levin et al., 2012; Maza et al., 2014). Entre las actividades oxidativas evaluadas en el presente capítulo, se ha confirmado la capacidad de producir lacasas durante el cultivo del orujo con *C. rigida*, *P. albobadia* y *P. sanguineus*, tal cual lo descrito por Saparrat et al. (2002a,b; 2010) y la potencial intervención de estas enzimas en la remoción de fenoles del orujo. En el caso de *T. harzianum* y *U. botrytis* no se detectaron actividades lacasa ni peroxidasa en la FSA durante el cultivo de estos hongos sobre el orujo de uva. Aunque ha sido reportada la producción de lacasas para *T. harzianum*, las mismas parecerían estar vinculadas a procesos de pigmentación de conidios y no como agentes detoxificantes de compuestos aromáticos, como los fenoles (Hölker et al., 2002; Asemoloye et al., 2018). No obstante, la no detección de enzimas puede ser el resultado de la retención de las mismas por la matriz miceliar o el sustrato, así como, de las condiciones y el momento de extracción, entre otros (López et al., 2002; Levin et al., 2012).

La transformación y detoxificación del orujo de uva de *V. labrusca* por los hongos saprófitos es un requisito clave para reducir el volumen de material generado por la actividad vinícola y conocer los cambios generados en matriz lignocelulósica ocasionados por la actividad fúngica. Reportes previos indicarían que los hongos de pudrición blanca, tales como los empleados en el presente estudio, son los agentes más eficientes en la reducción y detoxificación de matrices lignocelulósicas recalcitrantes; siendo clave la participación de enzimas de naturaleza oxidativa en el proceso (Dorado et al., 1999; Saparrat et al., 2010; Andrade et al., 2012). A pesar de que *C. rigida*, *P. albobadia* y *P. sanguineus* redujeron los fenoles presentes en el orujo de *V. labrusca*, mediante la participación de lacasas como mecanismo de detoxificación, presentaron

una menor capacidad para reducir el peso seco del orujo comparado con *G. sepiarium* y *U. botrytis*. Si bien *G. sepiarium* produjo la mayor pérdida de peso a los 30 días de incubación, vinculada a la participación de endoglucanasas y xilanasas, mantuvo el nivel de fenoles similares al control abiótico y produjo la liberación de $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$ en el proceso, siendo ambos compuestos reportados como tóxicos para otros microorganismos y plantas (Iglesias Jiménez & Perez Garcia, 1989; Tiquia et al., 1996). En cambio, *U. botrytis* provocó la mayor pérdida de peso y además durante el proceso redujo los niveles de $\text{NH}_4^{+1}\text{-N}$ y fenoles, incluyendo la alcalinización del orujo. Por lo cual, en base a los cambios físico-químicos generados en el orujo se permitiría considerar al tratamiento con *U. botrytis* como el más adecuado en vistas de emplear el producto generado como abono orgánico.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DEL ORUJO TRANSFORMADO CON LOS HONGOS COMO ABONO ORGÁNICO



IV.1- INTRODUCCIÓN

La transformación fúngica de los subproductos agroindustriales debe generar un producto con características tales que su incorporación al suelo como abono sea viable. Ante la ausencia de una normativa sobre las características que convierten a un potencial sustrato en apto para ser utilizado como abono orgánico bajo este tipo de tratamiento, es recomendable adoptar los parámetros que se demandan para la producción de compostaje o vermicompostaje (Resolución SENASA 264/11; Tiquia et al., 1996). Entre las características físico-químicas frecuentemente empleadas se encuentran el contenido de M.O., macronutrientes, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y sales (C.E.); así como también, la relación C/N y el pH (Bernal et al., 1998). La revalorización de subproductos de la industria oleica como abono mediante esta técnica promisorio demostró que el accionar de los hongos sobre el sustrato produce un espectro diferencial en la concentración y disponibilidad de nutrientes (Sampedro, et al. 2007). Resultados similares se reportaron sobre sustratos derivados del cultivo de hongos comestibles, incluyendo además, alteraciones en el contenido de sales (Jordan et al., 2008; Paredes & Medina, 2009; Ribas et al., 2009). Aparejado a estos cambios, el material transformado con los hongos es probable que contenga sustancias que pueden afectar la actividad de los microorganismos del suelo y las plantas; esto sugiere que cuando se modifican sustratos por la actividad fúngica o como en otros bioprocesos, es indispensable monitorear la presencia de inhibidores por medio de bioensayos de fitotoxicidad (Tiquia et al., 1996). La detoxificación de residuos derivados de la industria oleica mediante hongos bajo FES reveló que la eficiencia del tratamiento varía en función del aislamiento fúngico empleado, la dosis aplicada y el tiempo requerido (Aranda et al., 2004, 2007; Sampedro et al., 2004, 2005; Reina et al., 2017). Entre los hongos de pudrición blanca empleados en procedimientos como los descritos se destacó la participación de *Corioloopsis rigida*, implicando la participación de lacasas y peroxidasas como los mecanismos que contribuyen a reducir la presencia de sustancias fenólicas fitotóxicas (Aranda et al., 2007; Saparrat et al., 2010). Resultados similares se obtuvieron empleando otros hongos rizosféricos tales como representantes del género *Fusarium* spp. y especies biocontroladoras de hongos patógenos como *Trichoderma harzianum* (Sampedro et al., 2004, 2007).

El orujo de uva de *V. labrusca* var. *isabella* es un subproducto de la actividad vinícola regional que tiene potencial como abono orgánico, destacándose su alto contenido de K,

sin embargo, cuando es incorporado al suelo inhibe el crecimiento de plantas de importancia agrícola (Capítulo II; Tiquia et al., 1996). En el capítulo II, se estudió el proceso de transformación del orujo de *V. labrusca* con 6 hongos saprótrofos bajo FES, dentro de los cuales se destacó la habilidad de *U. botrytis* para degradar y modificar el mismo; desconociéndose el potencial del orujo transformado como abono orgánico. El objetivo del presente capítulo fue evaluar los parámetros físico-químicos y biológicos del orujo de uva de *V. labrusca* tratado con los hongos saprótrofos bajo FES. El conocimiento de estos parámetros permitirá establecer la viabilidad del uso de esta matriz y bioproceso como abono orgánico.

IV.2- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1- Obtención del orujo de uva y su acondicionamiento

El orujo de uva se incubó con los hongos saprótrofos bajo FES siguiendo la metodología descrita en el punto III.2.3, pero empleando bolsas de polipropileno de 30x50 cm conteniendo 200 g de orujo seco. El experimento presentó un diseño completamente aleatorizado con 4 réplicas por tratamiento. Una alícuota del material fresco expuesto al tratamiento con los hongos después de 90 días de incubación, así como el control no inoculado, se secó a 60 °C y se molió hasta obtener un tamaño de partícula < 1 mm, siendo destinado para las determinaciones analíticas y fitotoxicidad en semillas. El resto del material fresco se utilizó en los ensayos de fitotoxicidad en plantas cultivadas en macetas.

IV.2.2- Determinaciones analíticas

IV.2.2.1- MO, NT, PT, Ca, Mg, Na y K

El contenido de MO, NT, PT, Ca, Mg, Na y K sobre base seca se determinó siguiendo las metodologías descritas en el punto II.2.2.2-4-5 y 8, respectivamente.

IV.2.2.2- COT

El contenido de COT en el orujo seco se estimó siguiendo la metodología reportada por Ball (1964).

IV.2.2.3- NH₄⁺-N y NO₃⁻-N

El contenido de NH₄⁺-N y NO₃⁻-N se determinó por micro-Kjeldahl (SAGyP/AACS, 2004). Se fraccionó 2 g de muestra seca en un tubo de centrifuga de 50 ml a la que se le

adicionó 10 ml de solución extractora 1 N de KCl y se agitó por 30 min. Luego la solución se filtró utilizando embudos Büchner y papel de filtro Whatman n° 40 (95 mm). A una alícuota de 3 ml del extracto colectado se le adicionó 50 mg de MgO, se destiló sobre H₃BO₃ y se valoró con 0,1 N de H₂SO₄ para determinar el contenido de NH₄⁺-N. A la mezcla remanente se le adicionó 30 mg de aleación de Devarda y se prosiguió a destilar y valorar para determinar el contenido de NO₃⁻-N.

IV.2.2.4-Fósforo asimilable (P_{asim}.)

Se determinó el contenido de P_{asim} siguiendo la metodología de Bray & Kurtz (IRAM-SAGPyA 29570-1). Se fraccionó 1 g de muestra seca en un tubo al que se le adicionó 7 ml de una mezcla de 0,03 N de NH₄HF₂ y 0,025 N de HCl a pH 2,6. Se tapó, se agitó horizontalmente por 5 min y se centrifugó. Luego se filtró utilizando embudos Büchner y papel de filtro Whatman n° 40 (95 mm). A una alícuota de 1 ml del extracto colectado se le agregó 3 ml de agua destilada, 0,2 ml de molibdato de amonio, 0,05 ml de una solución de Cl₂Sn y se agitó. Tras dejar reposar 30 min, se realizó la lectura a 882 nm usando un espectrofotómetro Metrolab (225 BD UV vis).

IV.2.2.5- pH_a y CE

El pH_a y la CE se determinaron siguiendo la metodología descrita en los puntos II.2.2.9 y II.2.2.10, respectivamente.

IV.2.3- Bioensayos de fitotoxicidad

Los ensayos de toxicidad se realizaron siguiendo las metodologías descritas en los puntos II.2.4.1 y II.2.4.2 con modificaciones. En el test de germinación-elongación radicular, las semillas se incubaron con distintas concentraciones de la FSA_{bs} obtenida a partir del orujo de uva control y el tratado con los distintos hongos saprófitos bajo estudio. La FSA_{bs} se obtuvo siguiendo la metodología reportada en el punto II.2.2.11, donde las cuatro muestras sólidas de orujo provenientes de un mismo tratamiento se mezclaron para generar una muestra compuesta. El experimento presentó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas por tratamiento. Tras el periodo de incubación de las semillas, se determinó la cantidad de semillas germinadas y la longitud radicular por placa. A partir de estos datos obtenidos se calculó la germinación (G, %), la longitud radicular (LR, %) relativos al control negativo (agua) y el índice de germinación (IG, %) empleando las Ec. II.3, 4 y 5; respectivamente. Para el ensayo en

plantas, se empleó macetas de 1 l conteniendo 20 t/ha de orujo de uva transformado con los distintos hongos sin ningún tipo de pretratamiento (peso fresco) como único factor de variación, incluyendo macetas sin la adición de orujo como control. La dosis de aplicación de orujo fue seleccionada en base a los resultados obtenidos en el capítulo II. El experimento se llevó a cabo empleando un diseño completamente aleatorizado con 10 réplicas por tratamiento. Se determinó el peso seco de la biomasa aérea (PSA), el número de hojas expandidas (HE), el índice de verdor (IV) y el área foliar total (AFT) usando un medidor LI-COR (modelo 3100).

IV.2.4- Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA, seguido de una comparación de medias realizado con el Test de Tuckey a posteriori ($p=0,05$); excepto para el número de hojas que fue analizado mediante un ANOVA y un test no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis). Previo al análisis estadístico los datos obtenidos de los parámetros de germinación fueron transformados a escala arcsen (Zar et al, 1999). Un análisis de componentes principales (ACP) se llevó a cabo para identificar los parámetros físico-químicos que producen la mayor variación entre el orujo control y los transformados con los hongos saprófitos. Un análisis de agrupamiento de disimilitud (distancias euclidianas) se llevó a cabo para diferenciar grupos entre los tratamientos del orujo (control y tratado con los hongos) en función a los parámetros físico-químicos determinados.

IV.3- RESULTADOS

En la tabla IV.1 se presenta la composición físico-química del orujo de uva control y del tratado con los distintos hongos saprófitos después 90 días. El contenido de MO y COT no presentó diferencias significativas tras la incubación con los hongos ($p > 0,05$). El tratamiento del orujo con *G. sepiarium*, *P. albobadia*, *T. harzianum* y *U. botrytis* aumentó el contenido de NT respecto al control, siendo este último hongo el que provocó el mayor incremento ($59,4 \pm 10,4$ %). A excepción del tratamiento con *P. albobadia*, la relación C/N del orujo se redujo después del tratamiento fúngico, siendo *U. botrytis* el que causó la mayor reducción respecto al control ($39,6 \pm 2,8$ %). Se observó un incremento en el contenido de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en los orujos transformados con *C. rigida*, *G. sepiarium*, *P. albobadia* y *T. harzianum* respecto al control, mientras que el tratamiento del orujo con *U. botrytis* redujo un $60,4 \pm 14,3$ % el contenido de esta forma

nitrogenada inorgánica respecto al control. En relación al contenido de NO_3^- -N, se observó un incremento del $379,2 \pm 60,8$ % y una reducción del $78,9 \pm 14,1$ % al incubar el orujo con *P. albobadia* y *U. botrytis*, respectivamente. En el caso del PT, un incremento del 32,7 y 17,4 % se observó en el orujo tratado con *T. harzianum* y *U. botrytis*, respectivamente. La transformación indistinta del orujo con *C. rigida*, *P. albobadia*, *T. harzianum* y *U. botrytis* produjo un incremento del $75,8 \pm 11,6$ % en el contenido de $\text{P}_{\text{asim.}}$, respecto al control. Si bien todos los hongos incrementaron el contenido de K respecto al control, el orujo tratado con *U. botrytis* presentó el mayor incremento ($319,9 \pm 77,2$ %). El tratamiento del orujo con los hongos redujo el contenido de Ca, siendo los cultivos con *C. rigida*, *P. sanguineus* y *T. harzianum* los que presentaron indistintamente la máxima reducción de este nutriente respecto al control ($98,3 \pm 1,1$ %). En contraposición, el contenido de Mg aumentó en el orujo tratado con los hongos respecto al control, excepto para *U. botrytis*, el cual lo redujo un $77,1 \pm 26,5$ %. Los niveles de Na encontrados en los orujos transformados con los hongos fueron similares al contenido presente en el orujo control, aunque *G. sepiarium* produjo un incremento del $46,6 \pm 31,2$ %. Un aumento en la CE se produjo sobre el orujo tratado con los hongos saprófitos, siendo el máximo incremento observado en el cultivo con *U. botrytis* ($188,6 \pm 36,3$ %). La actividad de los hongos modificó el pH ácido del orujo, el cual alcanzó la neutralidad sólo en el orujo tratado con *U. botrytis*.

Tabla IV.1. Composición físico-química del orujo de uva control y transformado con los hongos saprófitos después de 90 días de incubación.

Parámetro	Control	<i>C. rigida</i>	<i>G. sepiarium</i>	<i>P. albobadia</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>U. botrytis</i>
MO (%)	91,4 ± 1,6 a	90,4 ± 1,0 a	89,4 ± 2,0 a	88,8 ± 4,6 a	89,6 ± 1,9 a	90,6 ± 1,2 a	88,4 ± 2,3 a
COT (%)	45,7 ± 0,8 a	45,2 ± 0,5 a	44,7 ± 1,0 a	44,4 ± 2,3 a	44,8 ± 1,0 a	45,3 ± 0,6 a	44,2 ± 1,2 a
NT (%)	2,0 ± 0,2 c	2,5 ± 0,2 bc	2,8 ± 0,29 ab	2,3 ± 0,2 ab	2,4 ± 0,1 bc	2,6 ± 0,4 b	3,2 ± 0,2 a
C/N	23,2 ± 1,7 a	18,6 ± 1,6 b	16,3 ± 1,7 bc	19,2 ± 2,5 ab	18,8 ± 0,4 b	17,8 ± 2,9 bc	14,0 ± 0,7 c
NH ₄ ⁺ -N (mg/Kg)	177,5 ± 58,8 c	313,1 ± 42,6 b	417,6 ± 20,3 a	323,3 ± 38,7 ab	149,5 ± 30,3 cd	333,2 ± 60,6 ab	70,3 ± 15,2 d
NO ₃ ⁻ -N (mg/Kg)	111,2 ± 40,3 bcd	164,5 ± 78,7 bc	136,5 ± 39,2 bcd	533,0 ± 67,6 a	69,0 ± 45,8 cd	194,1 ± 56,1 b	23,4 ± 15,7 d
PT (g/Kg)	2,5 ± 0,1 c	2,7 ± 0,1 bc	2,7 ± 0,1 bc	2,8 ± 0,1 bc	2,8 ± 0,1 bc	3,3 ± 0,3 a	2,9 ± 0,1 b
P _{asim.} (g/Kg)	1,1 ± 0,1 b	2,0 ± 0,2 a	1,7 ± 0,6 ab	1,9 ± 0,0 a	1,7 ± 0,4 ab	2,0 ± 0,1 a	1,9 ± 0,1 a
K (g/L)	2,2 ± 0,1 e	5,0 ± 0,2 bcd	6,7 ± 0,5 b	5,6 ± 0,9 bc	3,7 ± 0,1 de	4,9 ± 0,1 cd	9,0 ± 1,7 a
Ca (mg/L)	625,0 ± 66,1 a	4,6 ± 1,1 c	273,3 ± 89,9 b	160,0 ± 46,2 b	8,0 ± 3,6 c	20,0 ± 1,4 c	220,0 ± 74,8 b
Mg (mg/L)	249,0 ± 34,5 b	410,5 ± 82,5 a	464,0 ± 56,6 a	504,0 ± 67,2 a	410,5 ± 83,0 a	459,3 ± 70,8 a	57,0 ± 46,0 c
Na (mg/L)	23,5 ± 2,7 ab	22,0 ± 5,3 b	34,3 ± 7,4 a	24,0 ± 6,4 ab	24,0 ± 1,8 ab	29,8 ± 6,2 ab	23,5 ± 1,7 ab
CE (dS/m)	6,0 ± 0,5 d	11,8 ± 0,3 b	13,9 ± 1,0 b	12,7 ± 1,3 b	9,4 ± 0,3 c	12,0 ± 0,3 b	17,3 ± 2,2 a
pH _a	3,6 ± 0,1 c	4,7 ± 0,3 b	4,8 ± 0,1 b	5,1 ± 1,2 b	4,5 ± 0,1 bc	4,6 ± 0,1 bc	6,9 ± 0,4 a

Medias y desvíos de cuatro réplicas. Para cada fila, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey's Test).

El resultado del ACP de los parámetros físicos-químicos del orujo de uva tratados con los distintos hongos se muestra en la Fig. IV.1. La sumatoria de las 2 primeras CP explicó el 73,3 % de la variación en el set total de datos. Los vectores de mayor peso para el CP 1 se corresponden con la relación C/N, el pH, la CE y el contenido de NT y K, dentro de los cuales sólo la relación C/N presentó una correlación negativa; lo cual separó al orujo control de los tratados con los hongos y a su vez entre ellos al tratado con *U. botrytis* del resto, conformando 3 grupos bien definidos. El CP 2 se halló representado por el contenido de Mg y $\text{NH}_4^+\text{-N}$ a través de una correlación positiva, que separó al orujo control y tratado con *U. botrytis* del resto de los orujos bajo tratamiento fúngico. El análisis de disimilitud por distancia euclidiana mostró la separación del orujo control de los tratados con los hongos (Fig. IV.2). Entre los orujos tratados, *U. botrytis* se diferenció del resto de los hongos coincidiendo con el resultado del ACP. El grupo más homogéneo se conformó por el orujo transformado con *C. rígida* y *T. harzianum*.

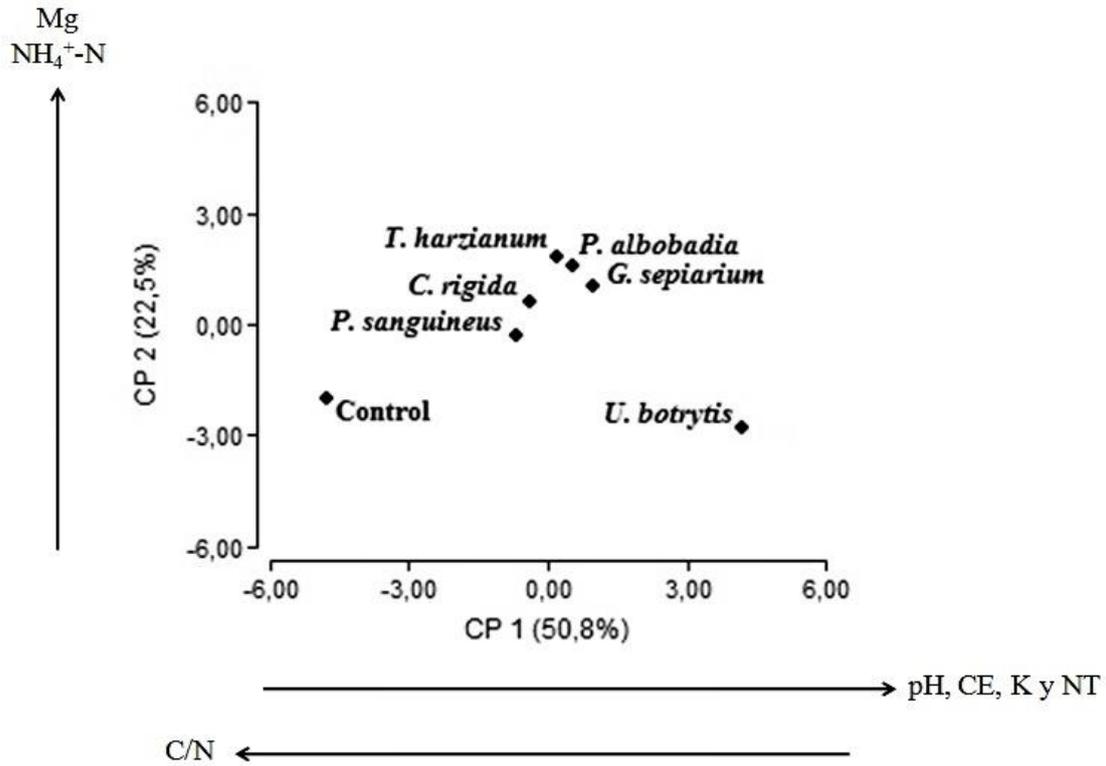


Fig. IV.1- ACP de los parámetros físico-químicos del orujo de uva control y transformado con los hongos saprófitos después de 90 días de incubación.

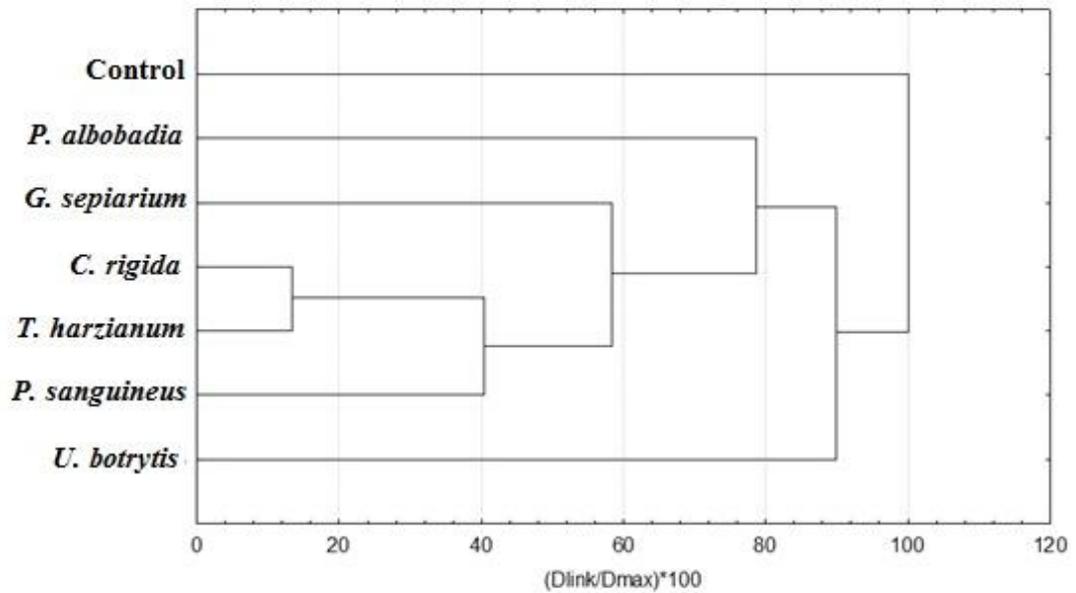


Fig. IV.2- Dendrograma de disimilitud entre el orujo de uva control y transformado con los distintos hongos utilizando distancias euclidianas.

La FSA_{bs} del orujo tratado con la mayoría de los hongos redujo el efecto tóxico causado sobre la germinación (G), la longitud radicular relativa (LR) y el índice de germinación (IG) de semillas de lechuga y tomate respecto al control; excepto para *G. sepiarium* que produjo un efecto igual o más nocivo dependiendo la especie vegetal evaluada (Tablas IV.2, 3 y 4). Se observó un porcentaje de $G \geq 80\%$ al aplicar la FSA al 5 % del orujo tratado con *P. albobadia*, *T. harzianum* y *U. botrytis* sobre semillas de lechuga respecto al control; mientras que en tomate la FSA al 10 % tratada con *C. rigida*, *P. albobadia* y *P. sanguineus* obtuvo el mismo resultado. Indistintamente de la especie vegetal utilizada para realizar el test, un incremento del 40 % en la LR solo se observó tras la aplicación de la FSA derivada del orujo tratado con *U. botrytis* al 1,25 %, respecto al control. Al combinar el G y el LR en el IG, sólo la FSA tratada con *U. botrytis* al 1,25 % obtuvo un valor $\geq 80\%$, independientemente a la especie vegetal testeada.

Tabla IV. 2- Efecto de la FSA_{bs} del orujo de uva control y transformado con los distintos hongos después de 90 días de incubación sobre la germinación relativa (%) de semillas de lechuga y tomate.

FSA _{bs} (% p/v)	Control*	<i>C. rigida</i>	<i>G. sepiarium</i>	<i>P. albobadia</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>U. botrytis</i>
Lechuga							
10	0,0 ± 0,0 e c	49,1 ± 6,5 b b	0,0 ± 0,0 e c	75,5 ± 3,3 a a	17,0 ± 5,7 cd b	13,2 ± 8,7 d b	34,0 ± 9,8 bc b
5	47,2 ± 3,3 c b	54,7 ± 8,7 c b	0,0 ± 0,0 d c	81,1 ± 8,7 ab a	71,7 ± 14,3 bc a	84,9 ± 9,8 ab a	94,3 ± 8,7 a a
2,5	81,1 ± 6,5 ab a	81,1 ± 8,7 ab a	84,9 ± 5,7 ab a	90,6 ± 5,7 ab a	66,0 ± 3,3 b a	90,6 ± 11,3 ab a	92,5 ± 8,7 a a
1,25	84,9 ± 5,7 a a	86,8 ± 8,7 a a	67,9 ± 5,7 a b	88,7 ± 6,5 a a	83,0 ± 19,9 a a	88,7 ± 3,2 a a	90,6 ± 5,7 a a
Tomate							
10	40,0 ± 4,3 bc b	80,0 ± 4,3 a c	20,0 ± 4,3 c b	82,5 ± 7,5 a a	90,0 ± 7,5 a b	52,5 ± 7,5 b b	77,5 ± 11,5 a b
5	82,5 ± 13,0 a a	92,5 ± 4,3 a b	82,5 ± 7,5 a a	92,5 ± 4,3 a a	90,0 ± 0,0 a b	85,0 ± 11,5 a a	90,0 ± 7,5 a ab
2,5	90,0 ± 7,5 a a	95,0 ± 4,3 a b	92,5 ± 8,7 a a	92,5 ± 4,3 a a	102,5 ± 4,3 a ab	87,5 ± 8,7 a a	95,0 ± 4,3 a ab
1,25	92,5 ± 4,5 a a	107,5 ± 4,3 a a	97,5 ± 7,5 a a	97,5 ± 7,5 a a	110,0 ± 4,3 a a	102,5 ± 11,5 a a	97,5 ± 0,0 a a

Media y desvío de tres réplicas. Para cada fila, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). Para cada columna, diferentes letras en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). * Corresponde a la FSA del orujo de uva sin tratamiento fúngico. Número de semillas germinadas en el control negativo (agua): 18 y 13,5 en lechuga y tomate, respectivamente. Control positivo (1 M de CuSO₄) sin germinación en ambas especies vegetales test.

Tabla IV. 3- Efecto de la FSA_{bs} del orujo de uva control y transformado con los distintos hongos después de 90 días de incubación sobre la longitud radicular relativa (%) de semillas de lechuga y tomate.

FSA (% p/v)	Control*	<i>C. rigida</i>	<i>G. sepiarium</i>	<i>P. albobadia</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>U. botrytis</i>
Lechuga							
10	0,0 ± 0,0 c d	23,9 ± 3,4 a b	0,0 ± 0,0 c c	23,8 ± 3,4 a c	16,3 ± 0,0 b c	16,3 ± 0,0 b c	16,3 ± 0,0 b d
5	20,1 ± 2,2 d c	30,1 ± 2,5 c b	0,0 ± 0,0 e c	41,7 ± 4,0 b b	24,9 ± 1,8 cd c	32,2 ± 5,0 c b	59,9 ± 2,3 a c
2,5	31,1 ± 2,3 bc b	38,9 ± 4,4 b b	19,6 ± 1,5 c b	69,3 ± 11,4 a a	39,2 ± 1,9 b b	39,5 ± 4,7 b b	75,0 ± 4,7 a b
1,25	53,9 ± 1,0 bc a	62,6 ± 17,6 b a	34,7 ± 3,0 c a	64,1 ± 10,7 b a	59,5 ± 11,2 bc a	57,0 ± 7,2 bc a	91,7 ± 1,0 a a
Tomate							
10	8,2 ± 2,4 cd b	19,3 ± 2,5 a c	4,3 ± 1,1 d d	20,8 ± 4,1 a b	11,4 ± 1,3 bc d	15,1 ± 1,9 ab c	5,6 ± 1,0 d d
5	16,1 ± 4,0 bc c	22,3 ± 2,6 abc c	14,1 ± 2,3 c c	35,2 ± 14,7 ab b	20,3 ± 0,6 abc c	29,6 ± 11,4 abc bc	37,4 ± 7,3 a c
2,5	38,1 ± 1,7 cd b	46,5 ± 5,5 bc b	28,3 ± 1,9 d b	58,5 ± 1,9 ab a	45,5 ± 5,2 bc b	48,8 ± 10,2 bc ab	63,5 ± 2,7 a b
1,25	45,4 ± 2,5 cd a	60,5 ± 4,4 bcd a	37,8 ± 0,8 d a	77,8 ± 7,8 ab a	62,9 ± 3,2 bc a	56,8 ± 2,0 bcd a	92,4 ± 9,0 a a

Media y desvío de tres réplicas. Para cada fila, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). Para cada columna, diferentes letras en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). * Corresponde a la FSA del orujo de uva sin tratamiento fúngico. Control negativo (agua): 12,2 ± 1, 4 y 6,5 ± 0,1 mm de longitud radicular media en lechuga y tomate, respectivamente.

Tabla IV. 4- Efecto de la FSA_{bs} del orujo de uva control y transformado con los distintos hongos después de 90 días de incubación sobre el índice de germinación (%) de semillas de lechuga y tomate.

FSA (% p/v)	Control*	<i>C. rigida</i>	<i>G. sepiarium</i>	<i>P. albobadia</i>	<i>P. sanguineus</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>U. botrytis</i>
Lechuga							
10	0,0 ± 0,0 c d	11,9 ± 3,4 a c	0,0 ± 0,0 c c	18,1 ± 3,3 a c	2,8 ± 0,9 b c	2,2 ± 1,4 b c	5,6 ± 1,6 b c
5	9,4 ± 0,7 d c	16,4 ± 1,9 c c	0,0 ± 0,0 e c	33,8 ± 3,7 b b	18,0 ± 4,7 c bc	27,0 ± 1,3 b b	56,5 ± 2,3 a b
2,5	25,3 ± 3,5 bc b	31,3 ± 0,7 b b	16,7 ± 1,4 c b	62,3 ± 6,6 a a	25,9 ± 2,4 bc b	36,1 ± 8,8 b b	69,1 ± 2,7 a a
1,25	45,8 ± 3,3 bc a	53,4 ± 11,0 b a	23,6 ± 2,9 c a	56,8 ± 9,6 ab a	50,4 ± 20,5 bc a	50,4 ± 5,2 bc a	83,1 ± 7,8 a a
Tomate							
10	3,3 ± 0,9 ef d	15,4 ± 2,3 ab c	0,9 ± 0,3 f d	17,4 ± 4,9 a c	10,3 ± 2,0 bc c	7,9 ± 1,8 cd c	4,3 ± 0,2 de d
5	13,0 ± 2,1 b c	20,6 ± 2,7 ab c	11,6 ± 1,1 b c	32,5 ± 13,1 a bc	18,3 ± 0,5 ab c	25,2 ± 9,9 ab bc	33,3 ± 3,8 a c
2,5	34,3 ± 3,7 cd b	44,3 ± 7,1 bc b	26,3 ± 4,0 d b	54,1 ± 1,6 ab ab	46,8 ± 7,1 abc b	42,3 ± 6,5 bc ab	60,4 ± 5,3 a b
1,25	41,9 ± 1,2 cd a	65,1 ± 7,0 bcd a	36,8 ± 2,5 d a	76,3 ± 13,4 ab a	69,2 ± 4,5 bc a	58,2 ± 7,0 bcd a	90,1 ± 8,8 a a

Media y desvío de tres réplicas. Para cada fila, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). Para cada columna, diferentes letras en negrita indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Tuckey test). * Corresponde a la FSA del orujo de uva sin tratamiento fúngico.

Los resultados obtenidos del efecto de la adición al suelo del orujo transformado con los hongos sobre el peso seco de la biomasa aérea (PSA), el número de hojas expandidas (HE), el área foliar total (AFT) y el índice de verdor (IV) de plantas de lechuga y tomate son presentados en las tablas VI.5 y 6. Mientras que la incorporación al suelo del orujo sin tratamiento fúngico redujo el PSA, número de HE y el AFT de las plantas de lechuga respecto al control, en tomate no se encontraron diferencias significativas. Variaciones en el PSA, número de HE y AFT de las plantas de lechuga y tomate se observaron producto de la adición del orujo tratado con los distintos hongos saprófitos al suelo respecto al mismo sin ninguna enmienda, cuyo efecto dependió de la especie fúngica y vegetal empleada. Los orujos tratados con la mayoría de los hongos indujeron un aumento en el PSA de las plantas de lechuga, siendo los cultivos con *C. rigida* y *P. sanguineus* los que presentaron el menor coeficiente de variación (CV). En relación al número de HE en lechuga, se observó un aumento de una unidad en las plantas cultivadas con orujo tratado con los hongos indistintamente entre los mismos. Estas plantas, además desarrollaron un mayor AFT, alcanzando entre un 51,5 y 98,7 % de incremento respecto al control; siendo los cultivos expuestos a *G. sepiarium*, *P. sanguineus* y *T. harzianum* los que presentaron menor C.V. Las plantas de tomate presentaron un aumento del PSA y desarrollaron una mayor AFT al cultivarlas con el orujo tratado con los hongos, respecto al control; aunque no se encontró diferencias significativas entre el tipo de hongo empleado los cultivos con *C. rigida* y *P. sanguineos* presentaron los menores C.V. para cada parámetro evaluado. Estas plantas además presentaron un aumento de una unidad en el número de HE al cultivarlas con la mayoría de los hongos estudiados. Respecto al IV, no se encontraron diferencias significativas en las plantas de lechuga y tomate cultivadas bajo los distintos tipos de tratamientos empleados ($p > 0,05$).

Tabla IV.5- Efecto de la adición al suelo del orujo de uva transformado con los hongos saprótrofos (20 t/ha) sobre el peso seco de la biomasa aérea (PSA), el número de hojas expandidas (HE), el área foliar total AFT y el índice de verdor (IV) de plantas de lechuga cultivadas durante 30 días.

Tratamiento	PSA (g/planta)	HE (nº/planta)	AFT (cm ² /planta)	IV (unidades SPAD)
control 1	0,7 ± 0,1 (19,4) c	7 bc	180,5 ± 22,3 (12,4) d	8,8 ± 1,0 (11,7) a
control 2	0,3 ± 0,1 (44,0) d	6 c	110,0 ± 44,5 (40,5) e	8,3 ± 0,7 (8,0) a
<i>C. rigida</i>	1,1 ± 0,1 (13,2) a	8 ab	273,3 ± 24,7 (9,0) c	8,4 ± 1,2 (13,7) a
<i>G. sepiarium</i>	1,1 ± 0,2 (21,1) ab	8,5 a	341,0 ± 36,6 (10,7) ab	9,8 ± 1,4 (14,6) a
<i>P. albobadia</i>	0,8 ± 0,1 (12,8) bc	8 ab	276,2 ± 36,2 (13,1) bc	8,8 ± 1,5 (16,6) a
<i>P. sanguineus</i>	1,1 ± 0,1 (13,4) ab	8 a	348,9 ± 43,4 (12,4) a	9,2 ± 1,3 (14,0) a
<i>T. harzianum</i>	0,9 ± 0,2 (20,8) ab	8 a	358,5 ± 45,5 (12,7) a	8,9 ± 1,6 (17,9) a
<i>U. botrytis</i>	1,0 ± 0,3 (27,2) ab	8 a	320,1 ± 87,5 (27,3) abc	9,4 ± 1,4 (14,7) a

Control 1 y 2 se corresponde a plantas cultivadas sin la incorporación y con la incorporación de orujo sin tratamiento fúngico al suelo, respectivamente. Media ± D.E. o mediana de 10 réplicas. Datos entre paréntesis corresponden al coeficiente de variación. Para cada columna, datos seguidos por distintas letras presentan diferencias significativas (Tuckey's Test o Kruskal-Wallis a posteriori, $p < 0,05$).

Tabla IV.6- Efecto de la adición al suelo del orujo de uva transformado con los hongos saprótrofos (20 t/ha) sobre el peso seco de la biomasa aérea (PSA), el número de hojas expandidas (HE), el área foliar total AFT y el índice de verdor (IV) de plantas de tomate cultivadas durante 30 días.

Tratamiento	PSA (g/planta)	HE (nº/planta)	AFT (cm ² /planta)	IV (unidades SPAD)
control 1	3,4 ± 0,3 (9,0) b	8 b	327,5 ± 45,0 (13,7) b	33,7 ± 3,5 (10,4) a
control 2	3,2 ± 0,3 (10,0) b	8 b	330,4 ± 46,0 (13,9) b	33,7 ± 3,8 (11,2) a
<i>C. rigida</i>	4,5 ± 0,4 (7,7) a	9 ab	420,7 ± 36,2 (8,7) a	36,2 ± 2,2 (6,1) a
<i>G. sepiarium</i>	4,8 ± 0,5 (17,8) a	9 a	455,8 ± 63,7 (14,0) a	35,4 ± 2,8 (7,9) a
<i>P. albobadia</i>	4,2 ± 0,5 (10,9) a	9 a	431,6 ± 53,1 (12,3) a	35,9 ± 3,1 (8,5) a
<i>P. sanguineus</i>	4,7 ± 0,4 (9,0) a	8,5 ab	445,7 ± 38,8 (8,7) a	34,1 ± 4,5 (13,2) a
<i>T. harzianum</i>	4,4 ± 0,5 (10,1) a	9 a	439,7 ± 60,4 (13,7) a	35,0 ± 4,5 (12,8) a
<i>U. botrytis</i>	4,4 ± 0,7 (15,6) a	9 a	402,6 ± 43,6 (10,8) a	33,3 ± 5,1 (15,4) a

Control 1 y 2 se corresponde a plantas cultivadas sin la incorporación y con la incorporación de orujo sin tratamiento fúngico al suelo, respectivamente. Media ± D.E. o mediana de 10 réplicas. Datos entre paréntesis corresponden al coeficiente de variación. Para cada columna, datos seguidos por distintas letras presentan diferencias significativas (Tuckey's Test o Kruskal-Wallis a posteriori, $p < 0,05$).

IV.4- DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó el potencial uso del orujo de uva de *V. labrusca* tratado con 6 hongos saprótrofos bajo condiciones de FES como abono orgánico. El tratamiento de una mezcla de porotos verdes (*Phaseolus vulgaris*), pimiento (*Capsicum annumm*), pepino (*Cucumis sativus*) y aserrín con *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor* provocó una reducción del 4,8 % en el contenido porcentual de MO después de 90 días de incubación (López et al., 2002). Los hongos inoculados en el orujo no afectaron el contenido de MO, lo cual sugiere que la actividad fúngica sobre el sustrato bajo estas condiciones de cultivo no fue suficiente para detectar diferencias, siendo ello posiblemente también dependiente de la metodología empleada. En este sentido, tampoco se encontraron diferencias en el contenido porcentual de COT en el orujo tratado con los hongos, aun cuando en las bolsas se observó su colonización por los diferentes hongos. En cultivos de alpeorujo con hongos de pudrición blanca tampoco se encontraron variaciones en el contenido porcentual de COT, a pesar de que el tiempo de incubación fue mayor al reportado en esta tesis (Sampedro et al., 2007). Si bien un aumento en el contenido de NT en el orujo tratado con *G. sepiarium*, *P. albobadia* y *U. botrytis* fue detectado, las diferencias encontradas podrían ser el resultado de un artefacto en el análisis estadístico de los datos. La relación C/N obtenida en el orujo tratado con la mayoría de los hongos presentó valores similares a los reportados para compostaje o vermicompostaje (Ferrer et al., 2001; Moldes et al., 2007; Martínez-Cordeiro et al., 2013). Puesto que una relación C/N de 10:1-15:1 es considerada como óptima para definir un producto estable a ser incorporado al suelo, sólo el tratamiento del orujo de uva de *V. labrusca* con *U. botrytis* resulta prometedor en la generación de un abono orgánico. El incremento en los niveles de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en la mayoría de los orujos tratados con los hongos sugiere que estos cumplen un rol clave en la degradación de proteínas y en la desaminación de compuestos nitrogenados orgánicos. Aun así los niveles de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ de los orujos transformados por los hongos son cercanos o están por debajo del límite establecido (400 mg/kg) para ser empleado como fertilizante orgánico, excepto cuando el orujo se trató con *G. sepiarium* (Bustamante et al., 2009). Por otro lado, el incremento en el contenido de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ evidenciado en el orujo tratado con *P. albobadia* genera interrogantes sobre el rol del hongo en la nitrificación heterótrofa, tal como fue descrito para *Aspergillus flavus* en medio de cultivo líquido empleando ácido aspártico como sustrato para la producción de nitratos (Stein, 2011). La reducción en el

contenido de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y NO_3^- en el orujo tratado con *U. botrytis* indicaría su incorporación de N en la biomasa fúngica. Durante la transformación del orujo, los hongos requieren además de nitrógeno otros nutrientes en base a la demanda metabólica que poseen. El calcio es un nutriente indispensable que juega un rol crucial en diferentes procesos metabólicos durante el crecimiento, desarrollo y reproducción de los hongos, así como, la formación de esporas y la producción de polímeros (Pitt & Ugalde, 1984; Roth-Bejerano et al., 2004). Por ende, la reducción en el contenido de Ca^{+2} en los orujos tratados con los hongos podría ser explicada principalmente por esta vía. En el orujo tratado con *U. botrytis* además se evidenció una notable reducción en el nivel de Mg^{+2} , esto podría deberse a su incorporación a la biomasa, incluyendo su inmovilización en las melaninas de las estructuras diferenciadas por este hongo demateáceo. Diferentes grupos químicos de las melaninas tienen la capacidad de establecer interacciones iónicas con el Mg^{+2} u otros metales (Fogarty & Tobin, 1996). La transformación del orujo con los hongos generó un producto con un contenido de sales (CE) mayor al material original (5,8 dS/m; Capítulo II) y por ende aún por encima del límite establecido para su empleo como abono orgánico; a diferencia de su tratamiento mediante compostaje y vermicompostaje (4 dS/m; Resolución SENASA 264/11; Ferrer et al., 2001; Moldes et al., 2007; Martínez-Cordeiro et al., 2013). Es conocido que la degradación de la materia orgánica provoca un aumento en la extractabilidad de los nutrientes contribuyendo al incremento en el contenido de sales (Paula et al., 2017). Con el fin de reducir el contenido de sales en el orujo se recomienda realizar un lavado, sin embargo, este proceso implica un costo adicional cuando se trabaja a gran escala (Roy et al., 2015). Por otro lado, la variación en el pH del orujo (4,5- 6,9) respondería a diferencias en los procesos metabólicos empleados por los hongos sobre este tipo de sustrato, coincidiendo con los resultados obtenidos en el capítulo III. Otros residuos agroindustriales, como paja de trigo y alpeorujo, también presentaron diferencias en el nivel de pH después del tratamiento con diferentes hongos saprótrofos (Sampedro et al., 2007). Un abono orgánico con un pH neutro o cercano a la neutralidad es preferido debido a que puede ser aplicado a una amplia gama de cultivos sin causar problemas de acidificación del suelo (Camacho Céspedes et al., 2018); por consiguiente, el tratamiento del orujo con *U. botrytis* es el único que no requeriría la aplicación de sustancias correctivas de pH, eliminando costos adicionales en el proceso. La relación C/N, el contenido de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, el pH y la C.E. son parámetros indicadores que frecuentemente son empleados en el seguimiento de procesos de transformación

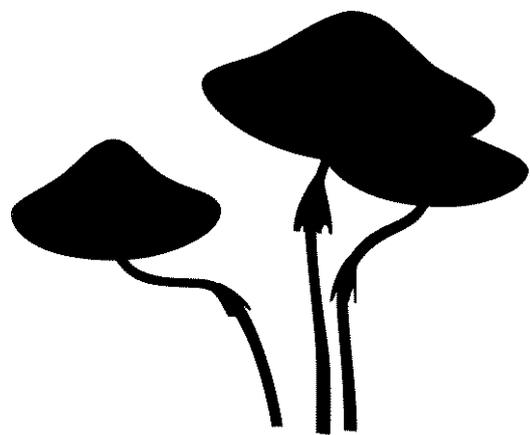
biológica de la materia orgánica para la obtención de abonos orgánicos (Tiquia et al. 1996; Ferrer et al., 2001; Sampedro, 2005; Moldes et al., 2007; Martínez-Cordeiro et al., 2013). Sobre la base del análisis del ACP, estos cuatro parámetros mencionados previamente, así como, las bases intercambiables de K^+ y Mg^{+2} fueron las variables que más contribuyeron a la discriminación de los tratamientos impuestos al orujo. Esto permitiría seleccionar el número variables de estudio y su incorporación al modelado del proceso para un monitoreo práctico del mismo. Así mismo, la identificación de tratamientos con características físico-químicas similares, como el orujo tratado con *C. rígida* y *T. harzanium*, o distintivos, como el de *U. botrytis*, a través del análisis de disimilitud, podría ser empleado para establecer un primer criterio de selección.

El compostaje y vermicompostaje del orujo de uva de *V. vinifera* ha sido reportado como estrategia para la eliminación de sustancias fitotóxicas, tras la aplicación de sus fracciones acuosas sobre semillas de berro de agua (*Lepidium sativum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y ray grass (*Lolium perenne* L.) (Nogales et al., 2005; Moldes et al., 2007). Después del tratamiento del orujo de *V. labrusca* con los hongos bajo FES, una reducción del efecto inhibitorio se observó en la mayoría de los hongos, excluyendo a *G. sepiarium*. Este resultado podría implicar la inactivación parcial de las sustancias tóxicas propias del orujo o las generadas durante el proceso de transformación por mecanismos fúngicos relacionados con la degradación o la inmovilización (Sampedro et al., 2007; Saparrat et al., 2010; Capítulo III). Por otro lado, el tiempo de cultivo del orujo con los hongos podría ser insuficiente para lograr una remoción total de estas sustancias tóxicas, o bien, para ello es necesario la participación de otros organismos tal como ocurre en los procesos de compostaje y vermicompostaje. Resultados similares se reportaron sobre semillas de berro de agua al aplicar extractos provenientes de subproductos molidos de industria oleica tratados con *C. rigida*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Trametes versicolor* (Martirani et al., 1996; Aranda et al., 2007). El estudio de parámetros de crecimiento de plantas de importancia agrícola también se ha empleado para evaluar la presencia de sustancias tanto de índole nociva como fitoestimulante (Sampedro et al., 2005; Ribas et al., 2009). En los cultivos con plantas de lechuga y tomate, una remoción total de la fitotoxicidad se obtuvo al incorporar al suelo el orujo de uva transformado con los hongos respecto al sin tratar; esto podría deberse a un efecto sinérgico ocasionado por la predigestión del orujo con los hongos y la capacidad de los suelos para adsorber, quelar o degradar compuestos de naturaleza nociva (Stevenson, 1972). No se detectaron diferencias en el crecimiento de

las plantas de tomate cultivadas con orujo autoclavado sin tratamiento fúngico respecto al control, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el capítulo II, donde se empleo la misma dosis de sustrato sin ningún tipo de pretratamiento térmico. Esto podría indicar que el efecto del calor húmedo a presión sobre el orujo no generó compuestos fitotóxicos o si bien si estos fueron generados resultaron estar por debajo del límite de tolerancia para esta especie vegetal o detoxificados por algún mecanismo del sistema suelo. Ciertos microorganismos rizosféricos, como *Fusarium oxysporum*, tienen la capacidad de degradar ciertos compuestos tóxicos y otros no (Sampedro et al., 2004). El tratamiento del orujo con los hongos además produjo un efecto fitoestimulante, el cual dependió del tipo de hongo y especie vegetal usada. Resultados similares se encontraron al cultivar plantas de tomate con alperujo tratado con diferentes hongos de pudrición, no obstante, previo a su aplicación este sustrato fue autoclavado (Sampedro et al., 2007; Reina et al., 2017). En relación a los resultados obtenidos en esta tesis, el efecto fitoestimulante podría ser producto a un aumento de la disponibilidad de los nutrientes en el orujo causado por el tratamiento con los hongos y su permanencia, el accionar de los microorganismos del suelo sobre el orujo predigerido incluyendo la liberación de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, como auxinas y giberelinas, aunque deben realizarse más estudios para comprobar esta hipótesis.

La información disponible sobre la FES con hongos como tecnología de tratamiento para la obtención de abonos o fertilizantes orgánicos es escasa (Sampedro et al., 2007; Reina et al., 2017). La transformación del orujo de *V. labrusca* bajo este tipo de tratamiento presentaría una serie de ventajas respecto a los métodos tradicionalmente empleados, compostaje y vermicompostaje. Mientras que el tratamiento con vapor húmedo al orujo elimina la posibilidad de introducir en el producto final organismos patógenos, el proceso de transformación con los hongos ocurre bajo condiciones controladas, libre de fluctuaciones ambientales que condicionan a los métodos tradicionales. Por otro lado, se podrían obtener otros productos de interés en el proceso o incorporar en el mismo para su optimización otros subproductos propios o no de la agroindustria vinícola, incrementando la sustentabilidad del sistema. Si bien aún son necesarios más estudios para profundizar en la temática, esta tesis sienta las primeras bases para revalorizar el orujo de *V. labrusca* como abono orgánico empleando la FES con hongos saprótrofos como estrategia de tratamiento.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo es posible concluir que:

- El orujo de *V. labrusca* var. *isabella*, que resulta de la producción del vino, no se puede utilizar como abono orgánico debido a la alta conductividad eléctrica, bajo pH y la presencia de sustancias fenólicas.
- El orujo de *V. labrusca* tiene efecto fitotóxico, que se manifiesta en la germinación y el crecimiento de las plantas.
- Los hongos ligninolíticos, *C. rigida* LPSC 232, *P. albobadia* LPSC 285 y *P. sanguineus* LPSC 163, modifican las sustancias fenólicas solubles del orujo involucrando enzimas con actividad lacasa.
- Los hongos evaluados sintetizan endoglucanasas y endoxilanasas que están involucradas en la despolimerización de la matriz sólida del orujo.
- La alcalinización del orujo como resultado de la actividad de *Ulocladium botrytis* LPSC 813 es independiente del proceso de amonificación.
- El efecto tóxico del orujo sobre semillas disminuye debido a la actividad de los hongos ligninolíticos, *C. rigida* LPSC 232, *P. albobadia* LPSC 285 y *P. sanguineus* LPSC 163, así como por los no ligninolíticos, *U. botrytis* LPSC 813 y *T. harzianum* FALH 18.
- El orujo transformado por los hongos evaluados es un sustrato sin fitotoxicidad y con actividad fitoestimulante cuando aplicado al suelo.

PERSPECTIVAS

A fines de complementar y continuar el estudio de la línea de investigación abordada en este trabajo de tesis doctoral, se propone tener en cuenta los siguientes puntos:

- Evaluar el efecto de la incorporación del orujo tratado con los hongos al suelo analizando sus propiedades físico-químicas y biológicas.
- Seleccionar en base a los resultados obtenidos un aislamiento fúngico para optimizar el proceso de obtención de un abono orgánico y la obtención de otros productos de interés.
- Analizar la factibilidad de revalorización de otros subproductos derivados de la “Cooperativa de la Costa” para promover una gestión sustentable de los residuos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbona, E., Sarandón, S., Marasas, M., 2007. Los viñateros de Berisso y el manejo ecológico de los nutrientes. *LEISA Rev. Agroecol.* 13–15.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2004. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.* 91, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00177-9)
- Alexopoulos, C.J., 1962. *Introductory mycology.* John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Allison, B.J., Simmons, C.W., 2018. Obtaining Multiple Coproducts from Red Grape Pomace via Anthocyanin Extraction and Biogas Production. *J. Agric. Food Chem.* 66, 8045–8053. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02250>
- Almanza Merchán, P.J., 2012. *Vid: (Vitis Vinifera L.), Manual para el cultivo de frutales en el trópico.*
- Almendros, G., Martínez, A.T., Martín, F., González-Vila, F.J., 1985. DEGRADATIVE OXIDATION PRODUCTS OF THE MELANIN OF *ULOCLADIUM ATRUM*, *Soil Bio/. Biochem.*
- Aloui, F., Abid, N., Roussos, S., Sayadi, S., 2007. Decolorization of semisolid olive residues of “alperujo” during the solid state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* 35, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.005>
- Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926–33.
- Andrade, F.A. de, Calonego, F.W., Severo, E.T.D., Furtado, E.L., 2012. Selection of fungi for accelerated decay in stumps of *Eucalyptus* spp. *Bioresour. Technol.* 110, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.069>
- Aranda, E., García-Romera, I., Ocampo, J.A., Carbone, V., Mari, A., Malorni, A., Sannino, F., De Martino, A., Capasso, R., 2007. Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and bioremediated components of dry

- olive mill residue. *Chemosphere* 69, 229–239.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.026>
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J.A., García-Romera, I., 2004. Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 132–135. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1368-6>
- Aranda, E., Sampedro, I., Ocampo, J.A., García-Romera, I., 2006. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58, 176–179.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.006>
- Arantes, V., Jellison, J., Goodell, B., 2012. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 323–338.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-3954-y>
- Arcanjo, N.M. de O., Neri-Numa, I.A., Bezerra, T.K.A., Silva, F.L.H. da, Pastore, G.M., Madruga, M.S., 2017. Quality evaluation of red wines produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): physicochemical parameters, phenolic composition and antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 37, 184–192.
<https://doi.org/10.1590/1678-457x.16516>
- Argade, A., Bishnoi, S., Ahlawat, S.S., 2017. Utilization of wine industry waste (Grape pomace) in processed meat products : A review. *Pharma Innov. J.* 6, 297–301.
- Asemoloye, M.D., Ahmad, R., Jonathan, S.G., 2018. Transcriptomic responses of catalase, peroxidase and laccase encoding genes and enzymatic activities of oil spill inhabiting rhizospheric fungal strains. *Environ. Pollut.* 235, 55–64.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.042>
- Avantaggiato, G., Greco, D., Damascelli, A., Solfrizzo, M., Visconti, A., 2014. Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.* 62, 497–507. <https://doi.org/10.1021/jf404179h>
- Bai, Z., Jin, B., Li, Y., Chen, J., Li, Z., 2008. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *J. Environmental Sci.* 20, 353–358.

- Baldas, B., Altuner, E.M., 2018. The antimicrobial activity of apple cider vinegar and grape vinegar, which are used as a traditional surface disinfectant for fruits and vegetables. *Commun.Fac.Sci.Univ.Ank.Series C* 27, 1–10. <https://doi.org/10.1501/Commuc>
- Bani, A., Pioli, S., Ventura, M., Panzacchi, P., Borruso, L., Tognetti, R., Tonon, G., Brusetti, L., 2018. The role of microbial community in the decomposition of leaf litter and deadwood. *Appl. Soil Ecol.* 126, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.02.017>
- Barbosa, F.S., Scavarda, A.J., Sellitto, M.A., Lopes Marques, D.I., 2018. Sustainability in the winemaking industry: An analysis of Southern Brazilian companies based on a literature review. *J. Clean. Prod.* 192, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.253>
- Bayramoglu, G., Gursel, I., Tunali, Y., Arica, M.Y., 2009. Biosorption of phenol and 2-chlorophenol by *Funalia trogii* pellets. *Bioresour. Technol.* 100, 2685–2691. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.042>
- Bernal, M.P., Paredes, C., Sanchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., 1998. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresour. Technol.* 63, 9. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00084-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00084-9)
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H.M.N., Hu, H., Zhang, X., 2017. Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 98, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.133>
- Botella, C., Diaz, A., de Ory, I., Webb, C., Blandino, A., 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem.* 42, 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.025>
- Botella, C., Ory, I. de, Webb, C., Cantero, D., Blandino, A., 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.020>
- Boulton, R., 1980. The relationships between total acidity, titratable acidity and pH in grape tissue. *Vitis* 19, 113–120.

- Braham, J.E., Bressani, R., 1979. Coffee pulp : composition, technology, and utilization. International Development Research Centre, Canada.
- Budak, H.N., Guzel-Seydim, Z.B., 2010. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2021–2026. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4047>
- Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M.D., 2008. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manag.* 28, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>
- Bustamante, M.A., Paredes, C., Morales, J., Mayoral, A.M., Moral, R., 2009. Study of the composting process of winery and distillery wastes using multivariate techniques. *Bioresour. Technol.* 100, 4766–4772. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.033>
- Camacho Céspedes, F., Uribe Lorío, L., Newcomer, Q., Masters, K., Kinyua, M., 2018. Bio-optimización del compost con cultivos de microorganismos de montaña (MM) y lodos digeridos de biodigestor (LDBIO). *UNED Res. J.* 10, 330. <https://doi.org/10.22458/urj.v10i2.2163>
- Cooke, R.C., Whipps, J.M., 1993. *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications.
- Corbin, K.R., Hsieh, Y.S.Y., Betts, N.S., Byrt, C.S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G.B., Burton, R.A., 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresour. Technol.* 193, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.030>
- Da Ros, C., Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P., 2016. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy* 91, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.017>
- Dávila, I., Robles, E., Egúés, I., Labidi, J., Gullón, P., 2017. The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape processing by-products, in: *Handbook of Grape Processing By-Products*. Elsevier Inc., pp. 29–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7/00002-8>

- Delabona, P. da S., Farinas, C.S., da Silva, M.R., Azzoni, S.F., Pradella, J.G. da C., 2012. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresour. Technol.* 107, 517–521. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.12.048>
- Diacono, M., Montemurro, F., 2011. Long-Term Effects of Organic Amendments on Soil Fertility, in: *Sustainable Agriculture Volume 2*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 761–786. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_34
- Díaz, A.B., Caro, I., de Ory, I., Blandino, A., 2007. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.006>
- Dinis, M.J., Bezerra, R.M.F., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C. V., Ferreira, L.M.M., Cone, J.W., Marques, G.S.M., Barros, A.R.N., Rodrigues, M.A.M., 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 100, 4829–4835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.036>
- Dix, N.J., Webster, J., 1995. *Fungal Ecology*. Springer Netherlands.
- Domínguez, J., Martínez-Cordeiro, H., Álvarez-Casas, M., Lores, M., 2014. Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Manag. Res.* 32, 1235–1240. <https://doi.org/10.1177/0734242X14555805>
- Domínguez, J., Sanchez-Hernandez, J.C., Lores, M., 2017. Vermicomposting of Winemaking By-Products. *Handb. Grape Process. By-Products Sustain. Solut.* 55–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00003-X>
- Dorado, J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, Á.T., Vares, T., Hatakka, A., 1999. Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 605–612. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00088-5)
- Durmaz, S., Özgenç, Ö., Boyacı, I.H., Yildiz, Ü.C., Erişir, E., 2016. Examination of the chemical changes in spruce wood degraded by brown-rot fungi using FT-IR and

- FT-Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 85, 202–207.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.04.020>
- Edman, M., Möller, R., Ericson, L., 2006. Effects of enhanced tree growth rate on the decay capacities of three saprotrophic wood-fungi. *For. Ecol. Manage.* 232, 12–18.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.001>
- El Achkar, J.H., Lendormi, T., Hobaika, Z., Salameh, D., Louka, N., Maroun, R.G., Lanoisellé, J.L., 2016. Anaerobic digestion of grape pomace: Biochemical characterization of the fractions and methane production in batch and continuous digesters. *Waste Manag.* 50, 275–282.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.02.028>
- Eraso, F., González, J., Medina, M., Pérez-Lanzac, J., 1991. Influencia del procesado y fecha de recogida sobre la composición química de los orujo de uva. *Arch. Zootec.* 40, 379–389.
- Fabbri, A., Bonifazi, G., Serranti, S., 2015. Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants. *Waste Manag.* 36, 156–165.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.022>
- Fernández, C.M., Ramos, M.J., Pérez, Á., Rodríguez, J.F., 2010. Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresour. Technol.* 101, 7019–7024.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.014>
- Ferraz, A., Parra, C., Freer, J., Baeza, J., Rodríguez, J., 2000. Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermisporea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 641–645.
<https://doi.org/10.1023/A:1008981521479>
- Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandlei, C., Marín, M., Ferrer, A., 2001. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresour. Technol.* 76, 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00076-6)
- Flavel, T.C., Murphy, D.V., Lalor, B.M., Fillery, I.R.P., 2005. Gross N mineralization rates after application of composted grape marc to soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1397–1400. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2004.12.003>
- Fogarty, R. V., Tobin, J.M., 1996. Fungal melanins and their interactions with metals.

- Enzyme Microb. Technol. 19, 311–317. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(96\)00002-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(96)00002-6)
- Garavaglia, J., Markoski, M.M., Oliveira, A., Marcadenti, A., 2016. Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health. *Nutr. Metab. Insights* 9, 59–64. <https://doi.org/10.4137/NMI.S32910>
- Garrido Valero, S., 1994. Interpretación de análisis de suelos, No. 5/93. Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario, Madrid.
- Ghafoor, K., AL-Juhaimi, F.Y., Choi, Y.H., 2012. Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitis labrusca* B.) Seeds. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67, 407–414. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0313-1>
- Göktürk Baydar, N., Özkan, G., Sema Çetin, E., 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y Aceites* 58, 29–33. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i1.5>
- Gómez, J., Pazos, M., Couto, S.R., Sanromán, M.Á., 2005. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *J. Food Eng.* 68, 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.005>
- Goula, A.M., Thymiatis, K., Kaderides, K., 2016. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. *Food Bioprod. Process.* 100, 132–144. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2016.06.016>
- Guerra-Rivas, C., Gallardo, B., Mantecón, Á.R., del Álamo-Sanza, M., Manso, T., 2017. Evaluation of grape pomace from red wine by-product as feed for sheep. *J. Sci. Food Agric.* 97, 1885–1893. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7991>
- Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J.L., 1995. Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Ecotoxicol. Environmental Saf.* 32, 29–33.
- Hamed, S.A.M., 2013. In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 78, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.013>
- Hayward, H.E., Wadleigh, C.H., 1949. Plant growth on saline and alkali soils, in: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1–38.

- Heredia-Guerrero, J.A., Benítez, J.J., Domínguez, E., Bayer, I.S., Cingolani, R., Athanassiou, A., Heredia, A., 2014. Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Front. Plant Sci.* 5, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00305>
- Higuchi, T., 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23–63. <https://doi.org/10.1007/BF00225306>
- Hölker, U., Dohse, J., Höfer, M., 2002. Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 47, 423–427. <https://doi.org/10.1007/BF02818702>
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Huang, D.-L., Zeng, G.-M., Feng, C.-L., Hu, S., Zhao, M.-H., Lai, C., Zhang, Y., Jiang, X.-Y., Liu, H.-L., 2010. Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress. *Chemosphere* 81, 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.09.029>
- Iglesias Jiménez, E., Perez Garcia, V., 1989. Evaluation of city refuse compost maturity: a review. *Biol. Wastes* 27, 115–142. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90039-6)
- International Organization of wine and vine- OIV, 2017. 2017 World Vitiviniculture Situation. Statistical report on world vitiviniculture.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M., Penninckx, M.J., 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 802–809. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00210-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00210-2)
- Jin, Q., Yang, L., Poe, N., Huang, H., 2018. Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.014>
- Jordan, S.N., Mullen, G.J., Murphy, M.C., 2008. Composition variability of spent mushroom compost in Ireland. *Bioresour. Technol.* 99, 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.012>

- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, Á., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100, 6378–6384. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.049>
- King, G.A., Wollard, D.C., Irving, D.E., Borst, W.M., 1990. Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Physiol. Plant.* 80, 393–400.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Kumar, N.S., Min, K., 2011. Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Chem. Eng. J.* 168, 562–571. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2011.01.023>
- Levin, L., Diorio, L., Grassi, E., Forchiassin, F., 2012. Grape stalks as substrate for white rot fungi, lignocellulolytic enzyme production and dye decolorization. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 105–12.
- Levy, J., 1966. The Soft Rot Fungi: Their Mode of Action and Significance in the Degradation of Wood. *Adv. Bot. Res.* 2, 323–357. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60253-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60253-0)
- Llorente, C., Bárcena, A., Vera Bahima, J., Saparrat, M.C.N., Arambarri, A.M., Rozas, M.F., Mirífico, M. V., Banerjee, R., 2012. *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 Produces the 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin-Like Compound and Carries a Putative pks Gene. *Mycopathologia* 174, 397–408. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9558-3>
- López-Abelairas, M., Álvarez Pallín, M., Salvachúa, D., Lú-Chau, T., Martínez, M.J., Lema, J.M., 2013. Optimisation of the biological pretreatment of wheat straw with white-rot fungi for ethanol production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 1251–1260. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0869-z>
- López, M.J., Elorrieta, M.A., Vargas-García, M. del C., Suárez-Estrella, F., Moreno, J., 2002. The effect of aeration on the biotransformation of lignocellulosic wastes by white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 81, 123–129. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00112-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00112-2)

- Lucarini, M., Durazzo, A., Romani, A., Campo, M., Lombardi-Boccia, G., Cecchini, F., 2018. Bio-Based Compounds from Grape Seeds: A Biorefinery Approach. *Molecules* 23, 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23081888>
- Luna, M.L., Murace, M.A., Keil, G.D., Otaño, M.E., 2004. Patterns of decay caused by *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma lucidum* (Aphyllophorales) in poplar wood. *IAWA J.* 25, 425–433. <https://doi.org/10.1163/22941932-90000375>
- Manan, M.A., Webb, C., 2017. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* 4, 511–532. <https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
- Martínez-Cordeiro, H., Álvarez-Casas, M., Lores, M., Domínguez, J., 2013. Vermicompostaje del bagazo de uva: fuente de enmienda orgánica de alta calidad agrícola y de polifenoles bioactivos. *Recur. Rurais.* 55–63.
- Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., Del Río, J.C., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8, 195–204.
- Martinez, G.A., Rebecchi, S., Decorti, D., Domingos, J.M.B., Natolino, A., Del Rio, D., Bertin, L., Da Porto, C., Fava, F., 2016. Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chem.* 18, 261–270. <https://doi.org/10.1039/c5gc01558h>
- 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 Res.* 30, 1914–1918. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00330-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00330-4)
- Martín, J., Sampedro, I., García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A., 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1769–1775. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00164-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00164-5)
- Mateo, J.J., Maicas, S., 2015. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Res. Int.* 73, 13–25.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.007>

- Maza, M., Pajot, H.F., Amoroso, M.J., Yasem, M.G., 2015. In-vitro degradation of Czapek and molasses amended post-harvest sugarcane residue by lignocellulolytic fungal strains. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.021>
- Maza, M., Pajot, H.F., Amoroso, M.J., Yasem, M.G., 2014. Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 87, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.020>
- Mazzarino, M.J., Satti, P., 2012. *Compostaje en la Argentina: experiencias de producción, calidad y uso*. Río Negro Universidad Nacional.
- Moldes, A.B., Vázquez, M., Domínguez, J.M., Díaz-Fierros, F., Barral, M.T., 2007. Evaluation of mesophilic biodegraded grape marc as soil fertilizer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141, 27–36. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9208-2>
- Moldes, D., Gallego, P.P., Rodríguez Couto, S., Sanromán, A., 2003. Grape seeds: The best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnol. Lett.* 25, 491–495. <https://doi.org/10.1023/A:1022660230653>
- Murace, M., Spavento, E., Keil, G., Saparrat, M.C.N., 2010. Pudrición castaña: efectos sobre las propiedades de resistencia mecánica de la madera. *Quebracho. Rev. ...* 18, 37–46.
- Murace, M., Spavento, E., Rivas, P., Saparrat, M.C.N., Keil, G., 2014. Comportamiento de *Pinus ponderosa* Dougl. ex. Laws. expuesto al hongo de pudrición castaña *Gloeophyllum sepiarium* (Wulf.: Fr.) P. Karst. *Quebracho (Santiago del Estero)* 22, 114–124.
- Nayak, A., Bhushan, B., Gupta, V., Rodriguez-Turienzo, L., 2016. Development of a green and sustainable clean up system from grape pomace for heavy metal remediation. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, 4342–4353. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.10.001>
- Nigam, P., Singh, D., 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *J. Basic Microbiol.* 34, 405–423. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620340607>
- Nizami, A.S., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O.K.M., Shahzad, K., Miandad,

- R., Khan, M.Z., Syamsiro, M., Ismail, I.M.I., Pant, D., 2017. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresour. Technol.* 241, 1101–1117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.097>
- Nogales, R., Cifuentes, C., Benítez, E., 2005. Vermicomposting of winery wastes: A laboratory study. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 40, 659–673. <https://doi.org/10.1081/PFC-200061595>
- OIV, 2008. Resolución CST 1/2008 Guía de la OIV para una vitivinicultura sostenible: producción, transformación y acondicionamiento de los productos.
- Okino, E.Y.A., Pastore, T.C.M., Camargos, J.A.A., Alves, M.V. da S., dos Santos, P.H. de O., Teixeira, D.E., Santana, M.A.E., 2009. Color variation of rubberwood clones and cypress infected by *Gloeophyllum striatum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63, 41–45. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2008.04.004>
- Oliveira, A.P. de, Módenes, A.N., Bragião, M.E., Hinterholz, C.L., Trigueros, D.E.G., de O. Bezerra, I.G., 2018. Use of grape pomace as a biosorbent for the removal of the Brown KROM KGT dye. *Bioresour. Technol. Reports* 2, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.05.001>
- Osono, T., 2007. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecol. Res.* 22, 955–974. <https://doi.org/10.1007/s11284-007-0390-z>
- Osono, T., Takeda, H., 2001. Organic chemical and nutrient dynamics in decomposing beech leaf litter in relation to fungal ingrowth and succession during 3-year decomposition processes in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Ecol. Res.* 16, 649–670.
- Otero, J., 2013. Factores de la reactivación de un producto agroalimentario típico: El vino de la Costa de Berisso, Argentina. *Cuad. Desarro. Rural* 10, 37–58.
- Özgenç, Ö., Durmaz, S., Boyacı, I.H., Eksi-Kocak, H., 2017. Determination of chemical changes in heat-treated wood using ATR-FTIR and FT Raman spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 171, 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.08.026>
- Pandey, A., 1992. Recent Process Developments Fermentation in Solid-State. *Process Biochem.* 27, 109–117.

- Paradelo, R., Moldes, A.B., González, D., Barral, M.T., 2012. Plant tests for determining the suitability of grape marc composts as components of plant growth media. *Waste Manag. Res.* 30, 1059–1065. <https://doi.org/10.1177/0734242X12451307>
- Paredes, C., Medina, E., 2009. Characterization of the Different Organic Matter Fractions of Spent Mushroom Substrate. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 40, 150–161. <https://doi.org/10.1080/00103620802625575>
- Paula, F.S., Tatti, E., Abram, F., Wilson, J., O’Flaherty, V., 2017. Stabilisation of spent mushroom substrate for application as a plant growth-promoting organic amendment. *J. Environ. Manage.* 196, 476–486. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.03.038>
- Pitt, D., Ugalde, U.O., 1984. Calcium in fungi. *Plant, Cell Environ.* 7, 467–475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01437.x>
- Pugh, G.J.F., 1980. Strategies in fungal ecology. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 75, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80188-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80188-4)
- Pujol, D., Liu, C., Gominho, J., Olivella, M.À., Fiol, N., Villaescusa, I., Pereira, H., 2013. The chemical composition of exhausted coffee waste. *Ind. Crops Prod.* 50, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.056>
- Rahardjo, Y.S.P., Tramper, J., Rinzema, A., 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* 24, 161–179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>
- Rao, J., Viraraghavan, T., 2002. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. *Bioresour. Technol.* 85, 165–171. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00079-2)
- Rashad, F.M., Saleh, W.D., Moselhy, M.A., 2010. Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1. Composting, quality, stability and maturity indices. *Bioresour. Technol.* 101, 5952–5960. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.103>
- Rasmussen, M.L., Shrestha, P., Khanal, S.K., Pometto, A.L., (Hans) van Leeuwen, J., 2010. Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Bioresour. Technol.* 101, 3526–3533.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.12.115>

- Reina, R., Liers, C., García-Romera, I., Aranda, E., 2017. Enzymatic mechanisms and detoxification of dry olive-mill residue by *Cyclocybe aegerita*, *Mycetinis alliaceus* and *Chondrostereum purpureum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 117, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.029>
- Ren, S., 2003. Phenol mechanism of toxic action classification and prediction: a decision tree approach. *Toxicol. Lett.* 144, 313–323. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00236-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00236-4)
- Resolución C.23/201, I.N. de V., 2013. Bebida elaborada con *Vitis labrusca* variedad isabella.
- Resolución SENASA 264/11, 2011. Manual para el registro de fertilizantes, enmiendas, sustratos, acondicionadores, protectores y materias primas en la República Argentina.
- Ribas, L.C.C., de Mendonça, M.M., Camelini, C.M., Soares, C.H.L., 2009. Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediation. *Bioresour. Technol.* 100, 4750–4757. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.059>
- Rockenbach, I.I., Rodrigues, E., Gonzaga, L.V., Caliari, V., Genovese, M.I., Gonalves, A.E.D.S.S., Fett, R., 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chem.* 127, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>
- Rodríguez, L.A., Toro, M.E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M.L., Gouiric, S.C., Vallejo, M.D., 2010. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 5914–5917. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.112>
- Romero-Romero, T., Sánchez-Nieto, S., SanJuan-Badillo, A., Anaya, A.L., Cruz-Ortega, R., 2005. Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae). *Plant Sci.* 168, 1059–1066.

<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2004.12.002>

- Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., Brosse, N., 2013. Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Ind. Crops Prod.* 43, 251–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.053>
- Rosales Soto, M.U., Brown, K., Ross, C.F., 2012. Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 592–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02882.x>
- Roth-Bejerano, N., Mendlinger, S., Kagan-Zur, V., 2004. Effect of calcium on growth of submerged *Terfezia boudieri* mycelium. *Mycoscience* 45, 30–34. <https://doi.org/10.1007/S10267-003-0156-6>
- Roy, S., Barman, S., Chakraborty, U., Chakraborty, B., 2015. Evaluation of Spent Mushroom Substrate as biofertilizer for growth improvement of *Capsicum annuum* L. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 3, 22–27. <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3305>
- Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S., 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 7500–7506. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.05.027>
- Sampedro, I., Aranda, E., Martín, J., García-Garrido, J.M., García-Romera, I., Ocampo, J.A., 2004. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Appl. Soil Ecol.* 26, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.10.011>
- Sampedro, I., D’Annibale, A., Ocampo, J.A., Stazi, S.R., García-Romera, I., 2005. Bioconversion of olive-mill dry residue by *Fusarium lateritium* and subsequent impact on its phytotoxicity. *Chemosphere* 60, 1393–1400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.093>
- Sampedro, I., Marinari, S., D’Annibale, A., Grego, S., Ocampo, J.A., García-Romera, I., 2007. Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.02.001>

- Sampedro Quesada, M.I., 2005. Disminución de la fitotoxicidad del alpeorajo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares.
- Sánchez, A., Ysunza, F., Beltrán-garcía, M.J., Esqueda, M., 2002. Biodegradation of Viticulture Wastes by *Pleurotus*: A Source of Microbial and Human Food and Its Potential Use in Animal Feeding. *J. Agric. Food Chemistry* 50, 2537–2542. <https://doi.org/10.1021/jf011308s>
- Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Santos, F.A., De Queiróz, J.H., Colodette, J.L., Fernandes, S.A., Guimaraes, V.M., Rezende, S.T., 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim. Nova* 35, 1004–1010. <https://doi.org/10.1093/nq/s1-V.119.141-b>
- Saparrat, M.C.N., Arambarri, A.M., Balatti, P.A., 2007. Growth response and extracellular enzyme activity of *Ulocladium botrytis* LPSC 813 cultured on carboxy-methylcellulose under a pH range. *Biol. Fertil. Soils* 44, 383–386. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0217-7>
- Saparrat, M.C.N., Bucsinszky, A.M.M., Alfio Tournier, H., Cabello, M.N., Arambarri, A.M., 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, 64–68. <https://doi.org/20001764> [pii]
- Saparrat, M.C.N., Jurado, M., Díaz, R., Romera, I.G., Martínez, M.J., 2010. Transformation of the water soluble fraction from “alpeorajo” by *Coriolorhiza rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere* 78, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.050>
- Saparrat, M.C.N., 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. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-5774-z>
- Saparrat, M.C.N., Mocchiutti, P., Liggieri, C.S., Aulicino, M.B., Caffini, N.O., Balatti, P.A., Martínez, M.J., 2008a. Ligninolytic enzyme ability and potential

- biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. *Process Biochem.* 43, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.016>
- Saparrat, M.C.N., Rocca, M., Aulicino, M.B., Arambarri, A.M., Balatti, P.A., 2008b. *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.05.005>
- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A., Rao, M., 2015. Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *J. soil Sci. plant Nutr.* 15, 333–352. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000031>
- Selim, S.M., Zayed, M.S., Atta, H.M., 2012. Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *Nat. Sci.* 10, 70–77. <https://doi.org/10.7537/marsnsj100212.12>
- Shinagawa, F.B., Santana, F.C. de, Araujo, E., Purgatto, E., Mancini-Filho, J., 2018. Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *Food Sci. Technol.* 38, 164–171. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.08317>
- Sisterna, M., Ronco, L., Voget, C., Marasas, M., Abbona, E., Romero, M., Daniele, J., Artaza, S., Otero, J., Sepúlveda, C., Avila, G., Loviso, C., Orosco, E., Bonicatto, M., Condes, C., Velarde, I., 2010. American Grapevine Culture and Research in Berisso, Argentina. *Am. J. Plant Sci. Biotechnol.* 3, 38–53.
- Soccol, C.R., Costa, E.S.F. da, Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P. de S., 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol. Res. Innov.* 1, 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61–68.
- Stein, L.Y., 2011. Heterotrophic Nitrification and Nitrifier Denitrification, in: *Nitrification. American Society of Microbiology*, pp. 95–114. <https://doi.org/10.1128/9781555817145.ch5>
- Stevenson, F.J., 1972. Role and Function of Humus in Soil with Emphasis on

- Adsorption of Herbicides and Chelation of Micronutrients. *Bioscience* 22, 643–650. <https://doi.org/10.2307/1296265>
- Stocco, M.C., 2014. Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular.
- Tiquia, S.M., Tama, N.F.Y., Hodgkis, I.J., 1996. Effects Pig-Manure on Phytotoxicity Sawdust Litter of Spent. *Science* (80-.). 93, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00052-8)
- Toscano, G., Riva, G., Duca, D., Pedretti, E.F., Corinaldesi, F., Rossini, G., 2013. Analysis of the characteristics of the residues of the wine production chain finalized to their industrial and energy recovery. *Biomass and Bioenergy* 55, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.015>
- Troncozo, M.I., Gómez, R.P., Arambarri, A.M., Balatti, P.A., Bucsinszky, A.M.M., Saparrat, M.C.N., 2015. Growth and oxidative enzymatic activity of in-vitro cultures of *Ciliochorella buxifolia*. *Mycoscience* 56, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.03.003>
- Vallejo, M.D., Martín, M.L., Monetta, P., Gouiric, S.C., 2012. Selection of Relevant Variables to the Enzyme Production on Red Grape Pomace by Solid-State Fermentation. *J. Life Sci.* 6, 608–614.
- Vazquez, M.E., Terminiello, A., 2012. Recuperación de suelos degradados de pequeños productores del cinturón hortícola del Gran La Plata. Valoración del problema y estrategias correctivas. La Plata.
- Velarde, I., Muchnik, J., Cittadini, R., 2013. ¡Al gran Pueblo Argentino, salud! El retorno del vino de la costa de Berisso. *Rev. la Fac. Agron.* 112, 45–61.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., Jones, E.B.G., 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour. Technol.* 97, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.015>
- Voriskova, J., Baldrian, P., 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J.* 7, 477–486. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.116>

- Vylkova, S., 2017. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. *PLoS Pathog.* 13, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006149>
- Wang, X., Sun, C., Wang, Y., Wang, L., 2002. Quantitative structure-activity relationships for the inhibition toxicity to root elongation of *Cucumis sativus* of selected phenols and interspecies correlation with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere* 46, 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00133-3)
- Yu, M., Zeng, G., Chen, Y., Yu, H., Huang, D., Tang, L., 2009. Influence of *Phanerochaete chrysosporium* on microbial communities and lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw. *Process Biochem.* 44, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.005>
- Zabaniotou, A., Kamaterou, P., Pavlou, A., Panayiotou, C., 2018. Sustainable bioeconomy transitions: Targeting value capture by integrating pyrolysis in a winery waste biorefinery. *J. Clean. Prod.* 172, 3387–3397. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.077>
- Zhang, X., Yu, H., Huang, H., Liu, Y., 2007. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 60, 159–164. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2007.02.003>
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y.S., Simmons, C.W., Zhang, R., Jenkins, B.M., Vanderghaynst, J.S., 2012. Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11128–11134. <https://doi.org/10.1021/jf303509v>

ANEXO

Tabla A1- Evolución de los parámetros físico-químicos de la FSA_{bh} del orujo de uva sin la inoculación fúngica (control).

Tiempo (días)	Azúcares reductores (mM)	NH₄⁺-N (mg. 100 ml -1)	Fenoles (mg. 100 ml -1)	pH	Abs. 395 nm
0	0,96 ± 0,05 b	4,09 ± 0,10 b	12,62 ± 0,96 a	3,55 ± 0,02 a	0,27 ± 0,02 a
30	0,82 ± 0,06 (-14,2) c	6,85 ± 0,61 (67,4) a	12,21 ± 0,25 (-3,2) ab	3,37 ± 0,02 (-4,9) b	0,24 ± 0,00 (-12,5) a
60	1,42 ± 0,03 (48,8) a	6,64 ± 0,84 (62,4) a	11,22 ± 0,09 (-11,1) b	3,59 ± 0,03 (-0,7) a	0,15 ± 0,03 (-45,4) b
90	0,95 ± 0,02 (-0,3) b	6,97 ± 0,40 (70,5) a	11,91 ± 0,40 (-5,6) ab	3,63 ± 0,05 (2,3) a	0,15 ± 0,02 (-45,8) b

Media y desvío de cuatro réplicas. Datos entre paréntesis corresponden al porcentaje de cambio a un tiempo determinado respecto al tiempo inicial. Para cada columna, letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey test, p<0,05).