



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Combinación de biotratamientos para la obtención de un abono orgánico a partir de orujo de uva

Trabajo Final de Carrera

Modalidad: Trabajo de Investigación

Alumno: Martín Eduardo Escaray

Director: Dr. Mario Carlos Nazareno Saparrat

Co-Director: Dra. María Inés Troncozo

Cátedra de Microbiología Agrícola

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, padre y hermana, que siempre me incentivaron y apoyaron en este camino, aconsejándome, guiándome y estando a mi lado.

A mis abuelos y abuelas; tíos y tías; primos y primas; que forman ese gran círculo de pertenencia que se ayuda y alegra mutuamente, sin importar los costos y consecuencias.

A mis amigos, principalmente a quienes hoy tengo el orgullo de llamar colegas, que recorrieron todo este camino conmigo, codo a codo, entre viajes, vivencias y alegrías.

Al Dr. Mario Saparrat, director de esta tesis, quien con su tiempo, dedicación y experiencia logró moldear este trabajo y enseñarme diferentes aspectos de la investigación.

A la Dra. María Inés Troncozo, co-directora de esta tesis, quien siguió paso a paso todo el proceso de este trabajo, brindándome desde su tiempo hasta consejos y aprendizajes.

A los docentes que tuve a lo largo de esta hermosa carrera, sobre todo a quienes me abrieron las puertas de las cátedras para que pueda ampliar mis conocimientos y despertar nuevas inspiraciones.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, y particularmente a las cátedras de Microbiología Agrícola, Edafología y Fitopatología, que brindaron sus espacios, instrumentos y tiempo para que yo pueda llevar a cabo los ensayos.

A la Cooperativa de la Costa, por abrir sus puertas y brindarnos el material sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo por facilitarme los recursos necesarios para mi trabajo.

A la Universidad Nacional de La Plata, por formarme profesional, ética, personal y políticamente.

Y al sistema educativo argentino, público, laico, gratuito y de calidad.

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1- INTRODUCCIÓN.....	5
1.1- El Vino de la Costa y la problemática de sus residuos sólidos.....	5
1.2- Estrategias de tratamiento biológico.....	7
2- OBJETIVOS.....	11
2.1- Objetivo general.....	11
2.2- Objetivos específicos:.....	11
3- MATERIALES Y METODOS.....	11
3.1- Material de partida.....	11
3.2- Organismos.....	12
3.2.1- Hongos.....	12
3.2.2- Lombrices.....	12
3.3- Transformación del orujo con hongos saprótrofos seleccionados bajo FES.....	13
3.4- Selección de sustratos transformados con hongos específicos para vermicompostaje.....	13
3.5- Vermicompostaje.....	14
3.6- Determinaciones analíticas y enzimáticas.....	15
3.6.1- Obtención de la fracción soluble acuosa base seca (FSA _{bs}).....	15
3.6.2- pH hidrolítico (pH _h).....	15
3.6.3- NH ₄ ⁺ -N.....	15
3.6.4- Conductividad eléctrica (CE).....	16
3.6.5- Fenoles.....	16
3.6.6- Actividad deshidrogenasa.....	16
3.6.7 - Test de Fitotoxicidad.....	17
4 - RESULTADOS.....	18
5 – DISCUSIÓN.....	27
6 – CONCLUSIONES.....	30
7 – BIBLIOGRAFIA.....	30

RESUMEN

El orujo de uva de *Vitis labrusca* var. Isabella es un sub-producto que se genera de la elaboración artesanal del “vino de la Costa”, cuya deposición en el sitio sin tratamiento previo puede ocasionar daños al ambiente. El vermicompostaje es el proceso más empleado para la obtención de abonos orgánicos a partir de sub-productos agroindustriales, como el orujo de uva. Las sustancias fenólicas y pH ácido presentes en el orujo de uva producen un efecto antagónico sobre lombrices y microorganismos, requiriendo este subproducto un pre-tratamiento previo al vermicompostaje. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del pre-tratamiento del orujo de *V. labrusca* var. isabella mediante fermentación en estado sólido (FES) con hongos saprótrofos sobre la calidad del vermicompostaje, respecto al pre-tratamiento de compostaje tradicional. Primero se determinó la permanencia de individuos adultos de *Eisenia foetida* (lombriz) sobre el orujo de uva esterilizado (autoclavado a 121 °C a 1,5 atm durante 30 min; humedad ajustada al 70 %) e inoculado individualmente con 6 hongos saprótrofos durante 30 días a 28 °C. Posteriormente, los pre-tratamientos de compostaje (PTC) y orujo tratado con *Ulocladium botrytis* LPSC 813 (PTU) fueron vermicompostados durante 90 días para evaluar la calidad del proceso. Con el primer ensayo, se reportó un porcentaje de permanencia de lombrices del 100 % sobre el orujo pre-tratado con *Coriolopsis rigida* LPSC 232 y *U. botrytis*, siendo seleccionado éste último para el segundo experimento. En el vermicompostaje se observó que el PTU redujo 30 días el tiempo de fase activa y presentó un mayor índice de germinación de semillas de lechuga respecto al PTC (44,0 y 25,2 %, respectivamente) a los 60 días. Los resultados obtenidos sugieren que el orujo pre-tratado con *U. botrytis* constituye una estrategia prometedora de revalorización del orujo de *V. labrusca* para su empleo como materia de partida para vermicompostaje.

1- INTRODUCCIÓN

1.1- El Vino de la Costa y la problemática de sus residuos sólidos

En Berisso (Partido de La Plata; Fig. 1-a), surgió la actividad agroindustrial vitivinícola a fines del siglo XIX a partir de una corriente migratoria de italianos, portugueses y españoles, entre otros (Otero, 2013). Ellos se instalaron en las tierras del monte costero donde implantaron la vid americana o Isabella (*Vitis labrusca* L.) bajo el sistema de parral (Fig. 1-b). Los viñedos de Isabella se adaptaron rápidamente a las condiciones locales, obteniéndose como resultado un vino diferente, de carácter regional, con aroma frutado y sabor característico (Velarde et al., 2008). En la actualidad, la superficie total de cultivo es de alrededor de 25 hectáreas a cargo de pequeños productores familiares nucleados que conforman “La Cooperativa de la Costa” (Fig. 1-c); los cuales han reportado una producción de 350 hectolitros de vino en el 2011 (Otero, 2013).

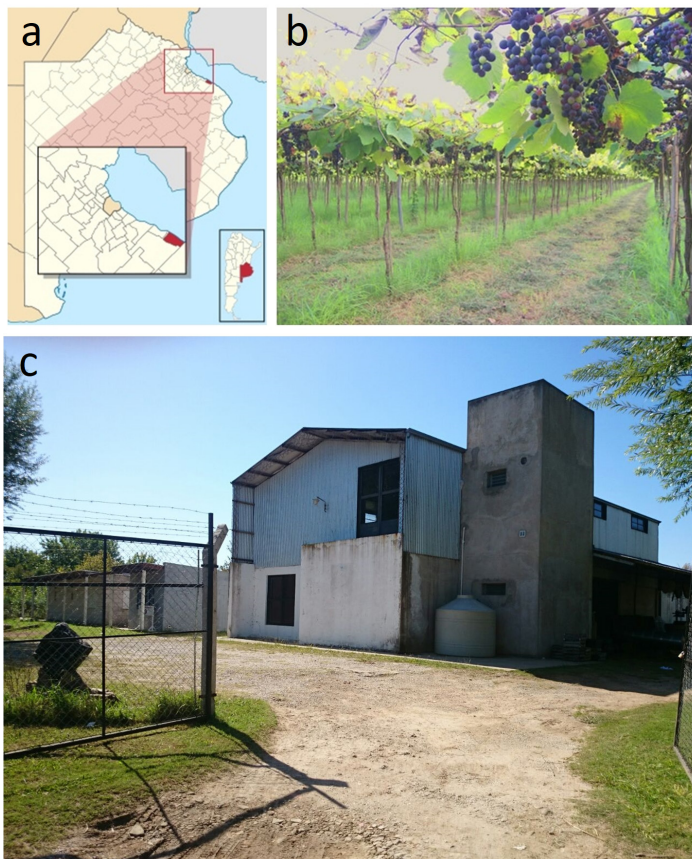


Fig. 1 - Vino de la Costa: a) Área de producción de la vid *V. labrusca* var. isabella en Buenos Aires (Argentina); b) Cultivo de *V. labrusca* bajo sistema de parral y c) Instalaciones de la Cooperativa de la Costa de Berisso.

Durante la elaboración del vino regional se origina una gran cantidad de subproductos sólidos de naturaleza lignocelulósica (Fig. 2-a), denominados comúnmente orujos de uva (hollejo, semillas y restos de pulpa), lo cual constituye aproximadamente un 15-20 % del total del material prensado (Martínez-Cordeiro et al., 2013). Este subproducto es apilado y almacenado en el sitio (Fig. 2-b) generando un reservorio potencial de patógenos y vectores de impacto sanitario y ambiental, sin existir una tecnología adecuada para su aprovechamiento.



Fig. 2 - El orujo de uva: a) Obtención del subproducto sólido después del prensado de la uva y b) sitio destino del orujo de uva y otros subproductos lignocelulósicos.

El orujo de uva de *V. labrusca* es un material orgánico rico en nutrientes claves, como N y K, para el crecimiento y desarrollo de plantas (Troncozo, 2019). Entre sus principales usos, su empleo como abono orgánico constituye una alternativa prometedora, lo que podría reducir el empleo de fertilizantes químicos y promover un uso sustentable y económico de los recursos de la Cooperativa de la Costa. Sin embargo previo a su aplicación sobre el suelo es indispensable transformar y estabilizar este subproducto; la acidez del residuo y la liberación de polifenoles característicos de la uva podrían provocar efectos nocivos sobre los microorganismos y/o las plantas restringiendo su uso como abono en los campos de cultivo (Bustamante et al., 2008, 2009; Saparrat et al., 2009). Desde el punto de vista nutricional, los polifenoles interfieren en la absorción del nitrógeno, no dejándolo disponible para el uso por parte de la planta (Bustamante et al., 2008; Saparrat et al., 2008); en el aspecto antibacteriano, los polifenoles actúan como un compuesto inhibidor de su crecimiento, tanto desde el hollejo y pulpa como desde las semillas, a la vez que el pH condiciona la microbiota que pudiera proliferar; y finalmente, este conjunto de factores interfiere con las plantas, condicionando su crecimiento e incluso inhibiendo la

germinación (Tiquia et al., 1996). Todas estas situaciones le confieren al sustrato características que lo limitan para ser aplicados en el suelo sin un tratamiento previo.

1.2- Estrategias de tratamiento biológico

Una de las alternativas para el tratamiento de residuos lignocelulósicos es el vermicompostaje (Bhat et al., 2017). Este proceso consiste en la bioxidación, degradación y estabilización de los sustratos orgánicos en dos etapas, una etapa inicial o activa mediante la acción de las lombrices que acondicionan y fragmentan el sustrato incrementando el área expuesta a los microorganismos y una etapa de maduración donde los microorganismos transforman los compuestos complejos y así aceleran la estabilización de la materia orgánica (Nogales et al., 2005; Martínez-Cordeiro et al., 2013; Domínguez et al., 2017; Fig. 3). Entre las especies vérmicas, *Eisenia foetida* se destaca por su hábito de consumo epigeo que le permite habitar el compostaje, la alta tasa de multiplicación y su gran voracidad, características que la convierten en la especie más difundida para la producción de “humus de lombriz” (Pellegrini et al., 2014).



Fig. 3 - El proceso de vermicompostaje incluye dos fases diferentes en relación a la actividad de las lombrices: (1) una fase activa durante la cual las lombrices ingieren y procesan la materia orgánica, mediante procesos intestinales (GAP, por la sigla en inglés) modifican su estado físico-químico y la composición microbiana; y (2) una fase de maduración, durante la cual los microorganismos son los encargados de la descomposición del sustrato transformado por las lombrices mediante procesos asociados al excremento (CAP, por la sigla en inglés).

En las poblaciones de lombrices, los individuos no se diferencian en macho y hembra ya que la regla es el hermafroditismo (Toccalino et al., 2004). Todas las lombrices adultas producen tanto óvulos como espermatozoides, y se aparean con otras lombrices por medio de fecundación cruzada, a partir de una región glandular engrosada llamada *clitelio*. Esta porción del cuerpo de la lombriz segrega tanto las células sexuales como mucus para copulación. A partir de este apareamiento las lombrices liberan cocones, que son cápsulas de entre 3 y 4 mm de diámetro, que luego de 25 a 30 días de incubación, eclosionan liberando de 3 a 10 lombrices juveniles cada uno. Estas lombrices entrarán en actividad sexual 40 a 60 días más tarde, cuando se convierten en adultos e inician nuevamente el ciclo (Fig. 4).

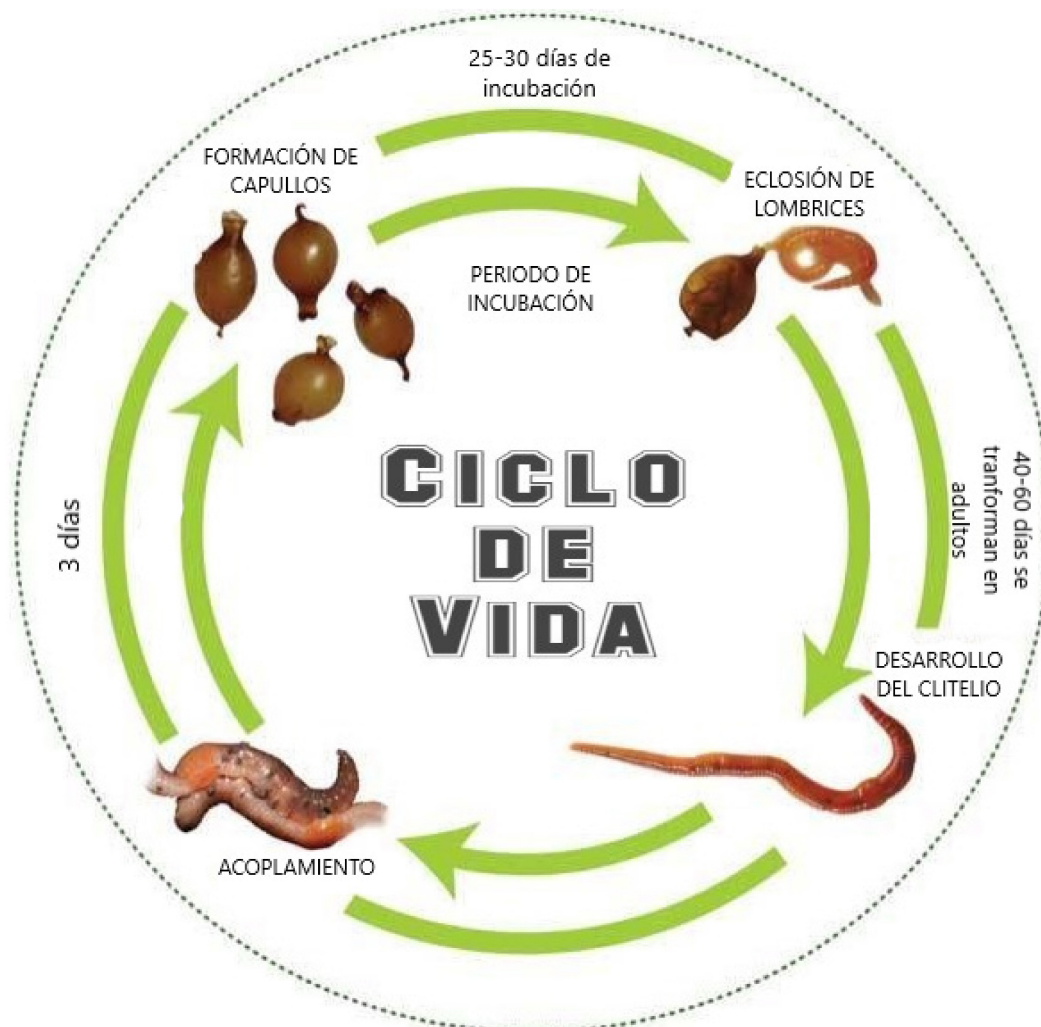


Fig. 4 - Ciclo de vida de la lombriz (Adaptado de Pellegrini et al., 2014).

Un sustrato pre-tratado y estabilizado para la siembra de las lombrices que participen en el proceso de vermicompostaje debe cumplir con ciertas características para su aceptación por parte de las lombrices. Entre las características, Pellegrini et al. (2014)

reportaron que el pH del sustrato debe estar entre 7,5 y 8; salinidad menor a 4 dS/m; contenido de humedad superior al 80%; y temperatura que se mantenga constante entre 18 y 25°C.

Aunque estudios previos reportan el uso del vermicompostaje con residuos de *V. vinifera* para la obtención de abono para plantas (Gómez-Brandón et al., 2011; Martínez-Cordeiro et al., 2013; Domínguez et al., 2014), no hay datos disponibles utilizando el orujo de *V. labrusca*. La acidez (pH 3,5) de este residuo sólido puede ser un factor limitante para la actividad de lombrices y de los microorganismos durante el proceso (Bhat et al., 2017). Asimismo, las semillas de uva son ricas en polifenoles, tanto solubles como insolubles (lignina), que no son asimilables por las lombrices y su transformación depende de los microorganismos capaces de colonizar el residuo (Martínez-Cordeiro et al., 2013). Todos estos aspectos limitantes conllevan a plantear la necesidad de indagar el proceso para la conversión del residuo de *V. labrusca* a una enmienda orgánica.

Entre las alternativas, una variante podría ser la incorporación de un pre-tratamiento del residuo con hongos saprótrofos específicos bajo condiciones de fermentación en estado sólido (FES), que podría generar un sustrato susceptible de ser vermicompostado. 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).

Estos sistemas de cultivo son factibles de obtener; evitando contaminaciones bacterianas y de levaduras por su baja actividad agua; y por su oxigenación en respuesta a su gran porosidad y aireación (Doelle et al., 1992). Una gran variedad de materiales pueden emplearse como soporte, que pueden ser sintéticos o naturales (Nigam & Singh, 1994). Actualmente, los soportes naturales son los más empleados debido a que son sitio de anclaje y fuente de carbono y energía para los microorganismos (Pandey, 1992). Los sustratos más buscados para la aplicación de la FES son los residuos generados en las actividades agrícolas, forestales y agroindustriales, 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). En líneas generales, podría verse a la FES como una tecnología potencial para la obtención de productos microbiológicos que den provecho a partir de residuos agro-industriales, que anteriormente parecían carecer de utilidad (Nogales et al., 2005; Chávez González et al., 2009). El 80% de los microorganismos utilizados en la FES corresponde a los hongos (Pandey, 1992). 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; Fig. 5).

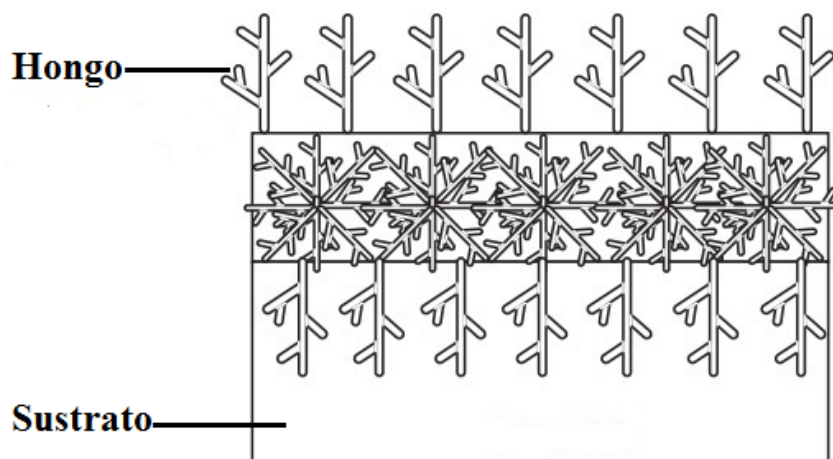


Fig. 5 - Crecimiento del micelio sobre un sustrato sólido (Adaptado de Rahardjo et al., 2006).

Los hongos creciendo sobre sustratos sólidos pueden distinguirse en diferentes grupos ecofisiológicos, en función del modo de nutrición y hábitat (Dix & Webster, 1995). De acuerdo con esta clasificación podemos distinguir a los hongos saprótrofos que son los principales encargados del reciclaje de la materia orgánica en los ecosistemas terrestres (Lindahl et al., 1999). Entre estos hongos, los ligninolíticos son prometedores en el acondicionamiento de residuos lignocelulósicos, debido a su habilidad para despolimerizar lignina y detoxificar un amplio espectro de compuestos orgánicos a través de la inespecificidad de sus sistemas enzimáticos (Jurado et al., 2011). Datos previos sobre el tratamiento del orujo del vino de la Costa con hongos saprótrofos seleccionados bajo condiciones controladas de laboratorio han revelado su capacidad para modificar las características físico-químicas del residuo y reducir su fitotoxicidad (Saparrat et al., 2009; Troncozo, 2019). Sin embargo, no se conoce si esta estrategia de tratamiento bajo condiciones de FES logra obtener un sustrato palatable para las lombrices y a su vez, también si tal combinación de procesos es compatible con la obtención de un producto con valor agregado.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

Evaluar el efecto de una secuencia de tratamientos sobre el orujo de uva incluyendo la transformación con hongos saprótrofos y el vermicompostaje para la elaboración de un abono orgánico.

2.2- Objetivos específicos:

1. Evaluar utilizando lombrices de *E. foetida* la palatabilidad del orujo de uva transformado con hongos saprótrofos seleccionados.
2. Caracterizar el proceso de vermicompostaje empleando el orujo tratado con un hongo saprótrofo seleccionado en un sistema bajo condiciones de invernáculo y su comparación con un sustrato equivalente expuesto a compostaje.

3- MATERIALES Y METODOS

3.1- Material de partida

El orujo de uva utilizado pertenece a la variedad Isabella (*Vitis labrusca* L.) colectada en la "Cooperativa de La Costa" (ubicada en Bagliardi y Tres de Abril, Berisso; latitud 34°53'22.70"S; longitud 57°49'21.11"O). Se obtuvieron muestras representativas durante el periodo de máxima producción (marzo y abril de 2017), que fueron recolectadas, a partir de la prensa de obtención del vino y de los depósitos de los residuos de la Cooperativa (Fig. 6), en 3 bateas (unificada como una mezcla compuesta) y trasladadas hasta el laboratorio bajo refrigeración para minimizar el desarrollo microbiano. Inmediatamente en el laboratorio, el material fue secado (estufa a 60 °C hasta peso constante) y alicuotado en bolsas de papel debidamente identificadas para finalmente ser almacenados en recipientes debidamente aislados.



Fig. 6 - Recolección del material en la Cooperativa de la Costa desde los depósitos de residuos no tratados.

3.2- Organismos

3.2.1- Hongos

Para estos estudios fueron empleados aislamientos fúngicos previamente caracterizados por el grupo de trabajo que presentan la habilidad para crecer sobre un amplio espectro de sustratos orgánicos: *Corioloopsis rigida* LPSC # 232, *Gloeophyllum sepiarium* LPSC # 735, *Peniophora albobadia* LPSC # 285, *Pycnoporus sanguineus* LPSC # 163, *Trichoderma harzianum* FALH # 18 y *Ulocladium botrytis* LPSC # 813, los cuales fueron mantenidos a 4 °C en estrías en medio agar-extracto de malta (2 %) (Saparrat et al., 2002, 2004, 2008).

3.2.2- Lombrices

Se utilizaron lombrices epigeas de la especie *E. foetida*, suministradas por la División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. La población fue mantenida siguiendo el protocolo descrito por Schuldt et al. (2005).

3.3- Transformación del orujo con hongos saprófitos seleccionados bajo FES

Se llevó a cabo el cultivo axénico de los hongos bajo FES durante 30 días a 28°C en oscuridad. Para ello se inoculó una suspensión micelial de cada hongo en forma individual en 250 g de orujo con 70% de humedad que se incubó estáticamente (Fig. 7); orujo expuesto a tratamiento térmico (ver abajo) sin inocular también fue incubado bajo las mismas condiciones a modo de testigo. El inóculo fúngico fue obtenido a partir de cultivos desarrollados en medio líquido de extracto de malta (2 %) incubados durante 7 días en oscuridad a 28°C.



Fig. 7 - Inoculación de los hongos en las bolsas con orujo esterilizado.

Previo a la inoculación el orujo fue colocado dentro de bolsas de polipropileno que fueron cerradas en el extremo con un tapón de algodón, sostenido con un cilindro de PVC de 4 cm de diámetro y 3 cm de largo; posteriormente, las bolsas fueron esterilizadas en autoclave a 121°C durante 40 minutos (tratamiento térmico). Este procedimiento se repitió a lo largo del trabajo a fin de disponer del material para usar en las actividades descritas en los puntos 3.4 y 3.5.

3.4- Selección de sustratos transformados con hongos específicos para vermicompostaje

Se realizó un ensayo en recipientes cilíndricos (500 cm³), donde se inocularon 4 lombrices cliteladas sobre los sustratos obtenidos en el punto 3.3 durante un periodo de 72 hs. en oscuridad (Fig. 8). Previo a la inoculación, la humedad fue corregida a 80 %. En paralelo, se colocaron recipientes con orujo sin tratamiento térmico y sin inocular con los hongos específicos a modo de un segundo control que fue incubado bajo condiciones de invernáculo por 30 días. Se determinó la cantidad de lombrices que permanecieron en el sustrato y los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje. Se analizó químicamente la fracción soluble acuosa (FSA) de los sustratos evaluados. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA y un Tuckey a posteriori (p= 0,05).



Fig. 8 - Disposición aleatoria de los distintos tratamientos durante el experimento.

3.5- Vermicompostaje



Fig. 9 – Alícuota con lombrices utilizadas para la inoculación de las literas usadas durante el respectivo tratamiento.

En base a los resultados obtenidos en el punto 3.4 se realizó el vermicompostaje del sustrato transformado con *U. botrytis*, que se fraccionó en literas rectangulares de 5 L perforados (vermireactores) para garantizar la aireación, las cuales fueron inoculadas con una población inicial de 15 lombrices cliteladas (individuos adultos; Fig. 9), habiendo armado el sistema en el invernáculo perteneciente al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE – CONICET – UNLP) con control de temperatura, e incubado durante un período de 90 días. Pevio a la

incorporación de las lombrices se corrigió la humedad del sustrato a 80%. En paralelo, se dispusieron literas conteniendo sustrato previamente tratado térmicamente y expuesto a compostar durante 30 días bajo condiciones de invernáculo a modo de control. Los vermireactores fueron cubiertos con una malla de sombra para mantener la humedad y asegurar la oscuridad en todo el sustrato (Fig. 10).

Para el seguimiento de la población de lombrices, se determinó el número de individuos maduros (clitelados) y juveniles (no clitelados), así como el número de cocones o capullos presentes en cada litera cada 30 días. Para los análisis de los parámetros físico-químicos y biológicos se recogieron muestras aleatoriamente sin reposición, las cuales fueron almacenadas en bolsas de plástico herméticas hasta el momento de uso y bajo las condiciones requeridas para realización de los análisis

propuestos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA y un Tuckey a posteriori ($p= 0,05$) o en caso de no cumplir con los supuestos requeridos fueron analizados mediante un test no paramétrico.



Fig. 10 – Literas contenedoras del orujo pre-tratado.

3.6- Determinaciones analíticas y enzimáticas

3.6.1-Obtención de la fracción soluble acuosa base seca (FSA_{bs})

Una muestra seca de orujo con un tamaño de partícula < 1 mm fue suspendida 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.

3.6.2- pH hidrolítico (pH_h)

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

3.6.3- NH₄⁺-N

El contenido de NH₄⁺-N en la FSA_{bs} se determinó por el método de King et al. (1990). A 100 µl de la FSA_{bs} 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 contenía fenol al 1% (p/v) y Na₂ [Fe(CN)₅NO] al 0,005 %

(p/v). El reactivo B contenía 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).

3.6.4-Conductividad eléctrica (CE)

Se determinó la CE en la FSA_{bs} de las muestras de orujo utilizando un Benchtop pH/mv meter (Sper Scientific). Los datos obtenidos se expresaron como mS/m.

3.6.5-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-Ciocalteau 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-Ciocalteau (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 Na₂CO₃ 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.

3.6.6- Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa se determinó siguiendo el método de Thalmann (1968) modificado. Se pesó a partir de cada muestra fresca, 2 g. de orujo en tubos de plástico con tapa, a las que se les añadió 4 ml de Trifenil Tetrazolium cloruro (TTC) en buffer Tris. El control contuvo solo la masa de orujo y el buffer Tris. La mezcla fue agitada en vórtex para su homogeneización; y posteriormente incubada a 30 °C, en oscuridad durante 24 hs. Bajo campana de extracción de gases se agregaron 5 ml de alcohol etílico para detener la reacción y extraer el Trifenil Tetrazolium formazan (TTF). Luego, los tubos fueron envueltos en papel de aluminio se agitaron en posición horizontal durante 30 minutos a 150 rpm. Posteriormente, se extrajo una alícuota de la mezcla y se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 rpm. En el sobrenadante obtenido se midió la absorbancia a 546 nm. Los resultados fueron expresados en µg de TPF/g/día de orujo seco.

3.6.7 - Test de Fitotoxicidad

El test se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Tiquia et al. (1996) con modificaciones (Tabla 1). Para ello, semillas de lechuga variedad criolla 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 3.6.1, 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 esterizaron en autoclave a 121 °C a 1,5 atm durante 20 min. Las placas conteniendo las semillas embebidas se incubaron en estufa (25 °C) en 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. 1- $G (\%) = (\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en presencia de la FSA a X \%} / \text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas en el control negativo}) * 100$

Ec. 2- $LR (\%) = (\text{promedio de la longitud radicular en presencia de la FSA a X \%} / \text{promedio de la longitud radicular en el control negativo}) * 100$

Ec. 3- $IG (\%) = (G * LR) / 100$

X, corresponde a la concentración del extracto acuoso aplicado.

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, 1999).

Tabla 1- Condiciones del Test de Fitotoxicidad

Cantidad de semillas por placa	20
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	25 °C
Tiempo de incubación	7 días

4 - RESULTADOS

Todos los hongos utilizados colonizaron el orujo contenido en las bolsas luego de los 30 días de incubación (Fig. 11), observándose que el cultivo de *C. rigida* presentó una estructura compacta (cementando los componentes de partida en una unidad) distinto a los demás, donde se observaron tamaños de partícula comprendidos entre 1 y 2 cm.

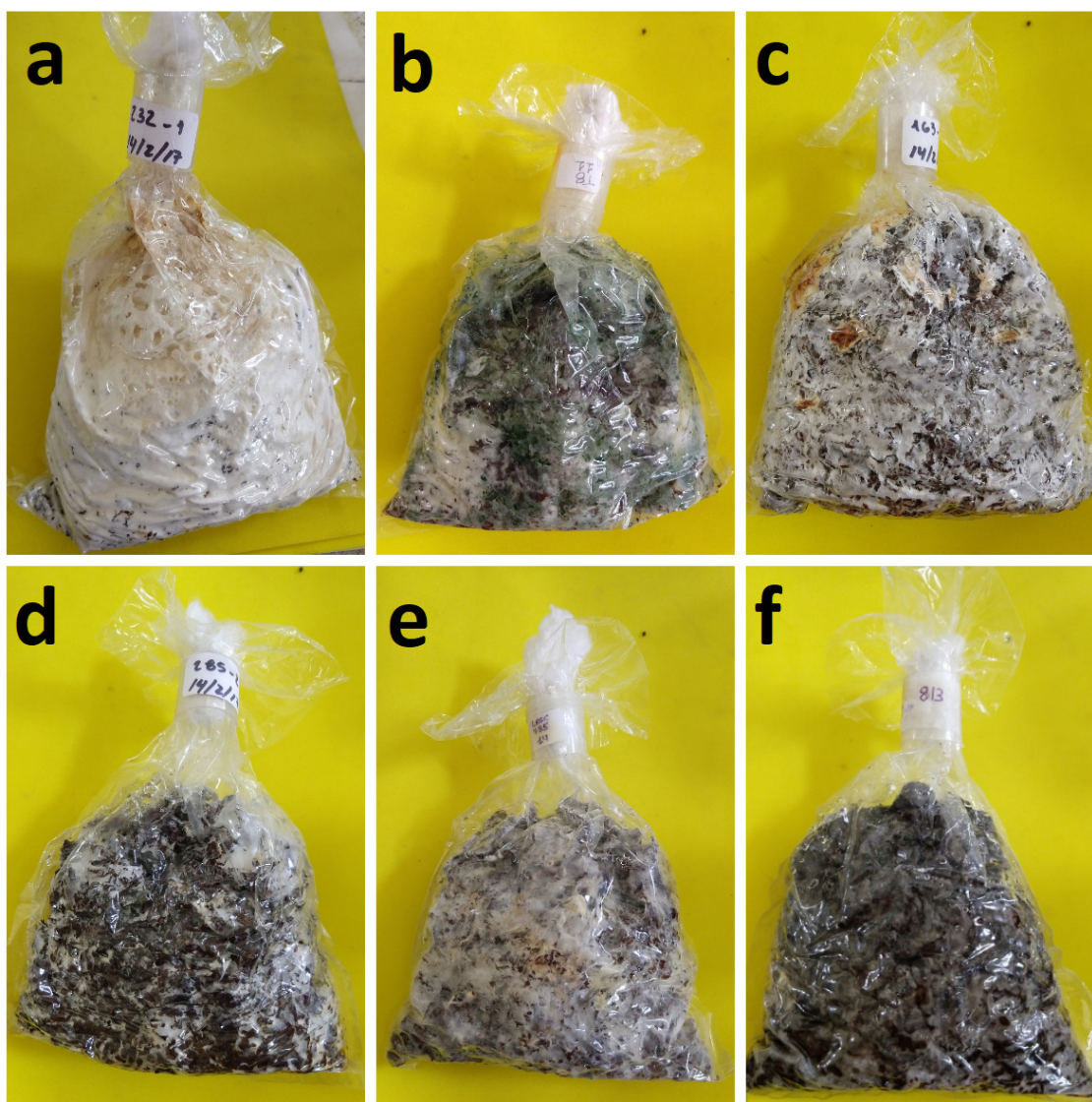


Fig. 11 - Orujo colonizado por los hongos después de 30 días de incubación: *Coriopsis rigida* LPSC # 232 (a), *Trichoderma harzianum* FALH # 18 (b), *Pycnoporus sanguineus* LPSC # 163 (c), *Peniophora albobadia* LPSC # 285 (d), *Gloeophyllum sepiarium* LPSC # 735 (e), y *Ulocladium botrytis* LPSC # 813 (f).

Los resultados del análisis de los diferentes parámetros físico-químicos analizados sobre alícuotas de la FSA_{bs} del orujo en ausencia y presencia de los hongos incubados por 30 días son mostrados en la Fig. 12. El contenido de fenoles en el orujo sin inocular después de la incubación (Co 2) se redujo respecto al tiempo inicial (Co 1), mientras que en el nivel de pH y conductividad eléctrica no se hallaron diferencias. La mayoría de los hongos redujeron el contenido de fenoles respecto al Co 2, siendo *P. albobadia* LPSC 285 el que presentó el mayor efecto reductor ($80,7 \pm 2,2$ %; Fig. 12-A). Sólo el orujo tratado con *U. botrytis* LPSC 813 produjo un aumento notable en el

pH en comparación con el Co2 ($127,37 \pm 24,8$ %; Fig. 12-B). Finalmente, el tratamiento con *C. rigida* fue el único que generó un incremento de la conductividad eléctrica, respecto al Co 2 ($59,8 \pm 6,2$ %; Fig. 12-C).

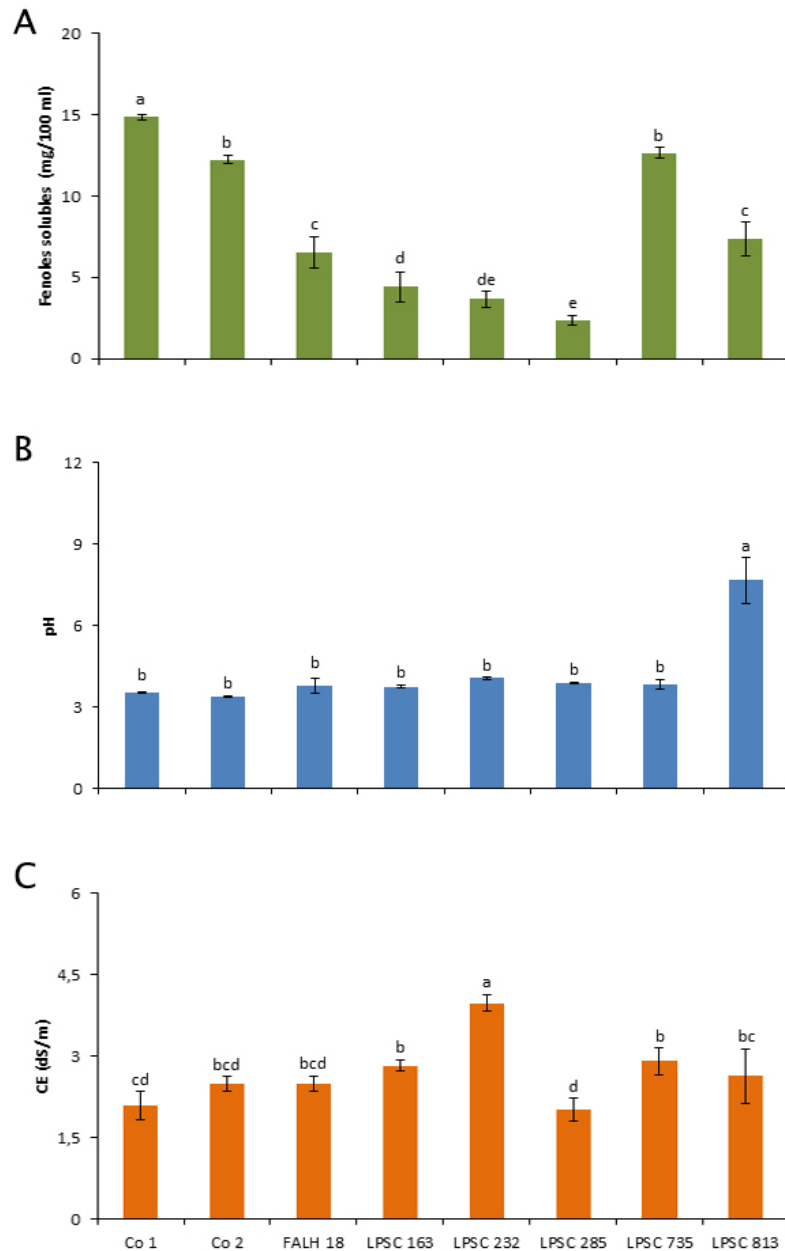


Fig. 12 - Contenido de fenoles solubles (A), pH (B) y CE (C) de la FSA del orujo de uva tratado con los hongos saprófitos después de 30 días de incubación. Letras distintas significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey test, $p < 0,05$). Co 1 y Co 2 corresponden al orujo sin inocular a los 0 y 30 días de incubación, respectivamente.

El pre-tratamiento del orujo con los hongos bajo condiciones de FES afectó la supervivencia de las lombrices en el sustrato (Fig. 13). La mayor permanencia se evidenció en los orujos tratados con *U. botrytis* LPSC 813 y *C. rigida* LPSC 232, donde se encontraron la totalidad de las lombrices inoculadas inicialmente, aunque los valores no fueron diferentes comparados a lo observado con el orujo tratado con *P. albobadia* LPSC 285.

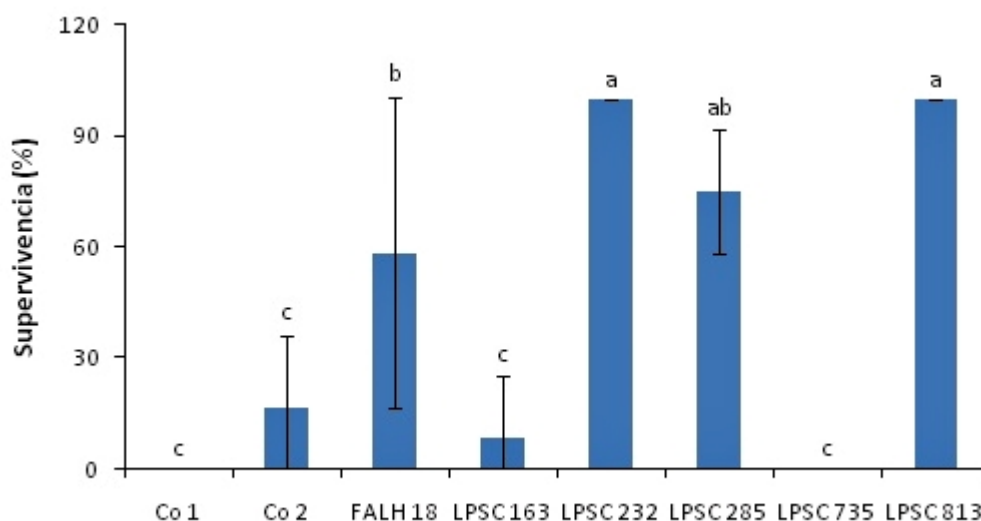


Fig. 13 - Porcentaje de supervivencia de lombrices adultas inoculadas en el orujo de uva tratado con los hongos saprófitos después de 30 días de incubación. Letras distintas significan diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey test, $p < 0,05$). Co 1 y Co 2 corresponden al orujo sin inocular a los 0 y 30 días de incubación; respectivamente.

Posteriormente, se realizó el segundo experimento para comparar el vermicompostaje de orujo pre-tratado con *U. botrytis* y el obtenido después del compostaje. Durante el proceso de vermicompostaje se observaron fluctuaciones en las características físico-químicas de la FSA_{bs} del orujo de uva pre-tratado mediante compostaje y FES con *U. botrytis* (Fig. 14). En la figura 14-A se observó que en el tiempo inicial la concentración de fenoles solubles fue significativamente menor en la FSA_{bs} de las muestras PTU comparadas con las correspondientes de PTC ($67,2 \pm 3,8$ %), situación que se mantuvo a los 30 días, aunque la brecha fue menor ($42,7 \pm 6,5$ %). En los tiempos sucesivos, la concentración de fenoles solubles no presentó diferencias entre tratamientos. En relación al contenido de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, únicamente al tiempo inicial se encontró diferencias entre los tratamientos, donde el PTU presentó la menor concentración ($98 \pm 0,1$ %; figura 14-B). En contraposición, diferencias significativas en

los niveles de pH solo se hallaron en el tiempo final, siendo PTU el tratamiento que presentó menor valor ($2,2 \pm 0,9$ %; figura 14-C). Finalmente, una menor conductividad eléctrica solo se halló en las muestras correspondientes a PTU respecto a aquellas del tratamiento PTC al tiempo inicial ($105,9 \pm 25,6$ %; figura 14-D).

En la figura 15 se muestran los cambios en el número de lombrices adultas, juveniles, cocones y en la relación cocones por adulto en el orujo de uva pre-tratado térmicamente y expuesto a compostar (PTC) o a transformar con *U. botrytis* LPSC 813 bajo FES (PTU) durante el proceso de vermicompostaje. No se encontraron diferencias en el número de lombrices adultas y juveniles durante todo el tiempo de incubación (Fig. 15-A y 15-B). Únicamente a los 30 días de iniciado el vermicompostaje se encontraron diferencias en el número de cocones (Fig. 15-C), siendo mayor en PTU ($566,7 \pm 164,4$ %). En la relación entre el número de cocones por adulto (Fig. 15-D), un mayor valor se registró en PTU a los 30 días ($514,8 \pm 167,6$ %).

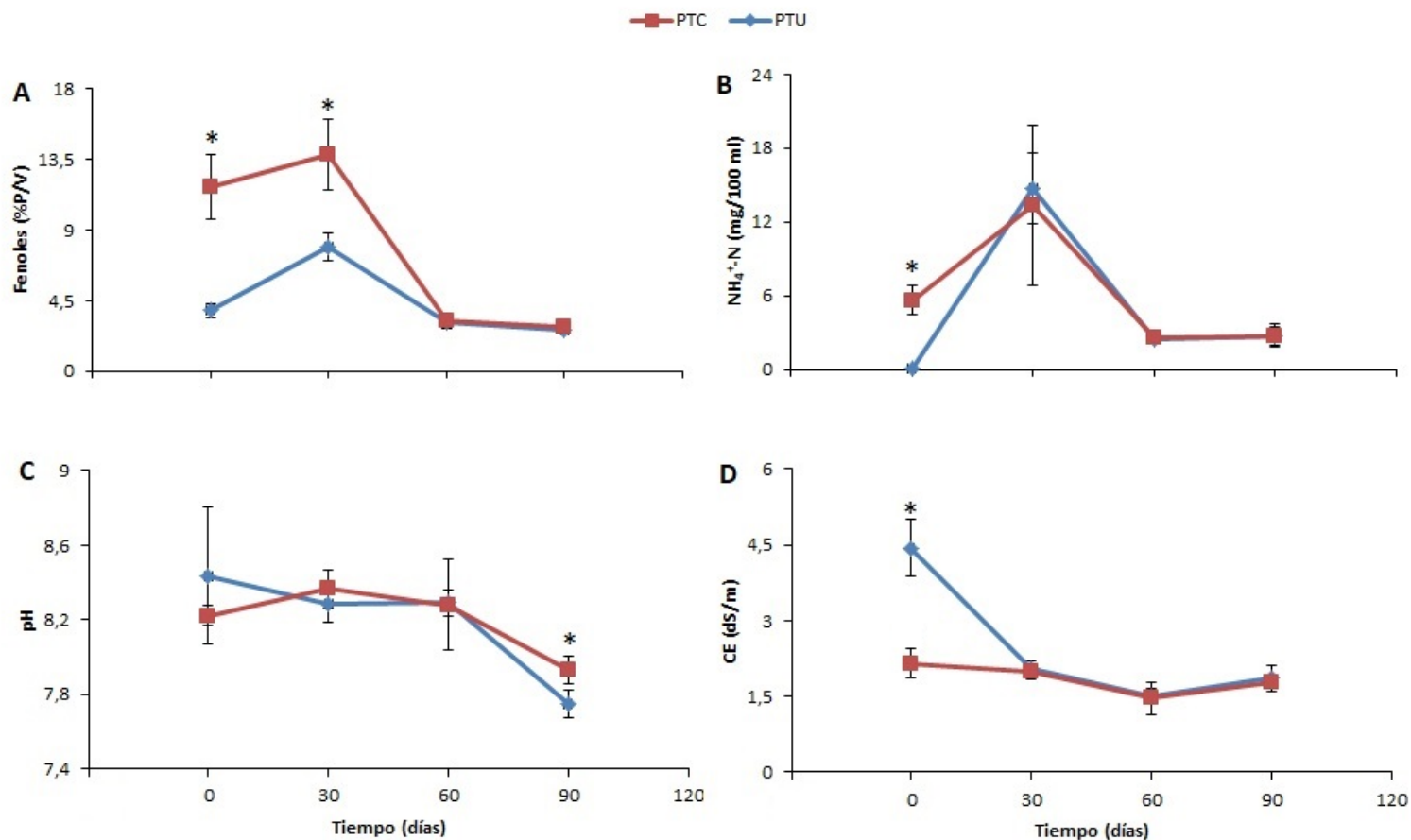


Fig. 14 - Cambios en los niveles de fenoles solubles (A), NH₄⁺-N (B), pH (C) y CE (D) de la FSA del orujo de uva pre-tratado térmicamente y expuesto a compostar (PTC) o a transformar con *U. botrytis* LPSC 813 bajo FES (PTU) durante el proceso de vermicompostaje. Para cada tiempo, se indican con un asterisco diferencias significativas entre los tratamientos (Test de T, $p < 0,05$).

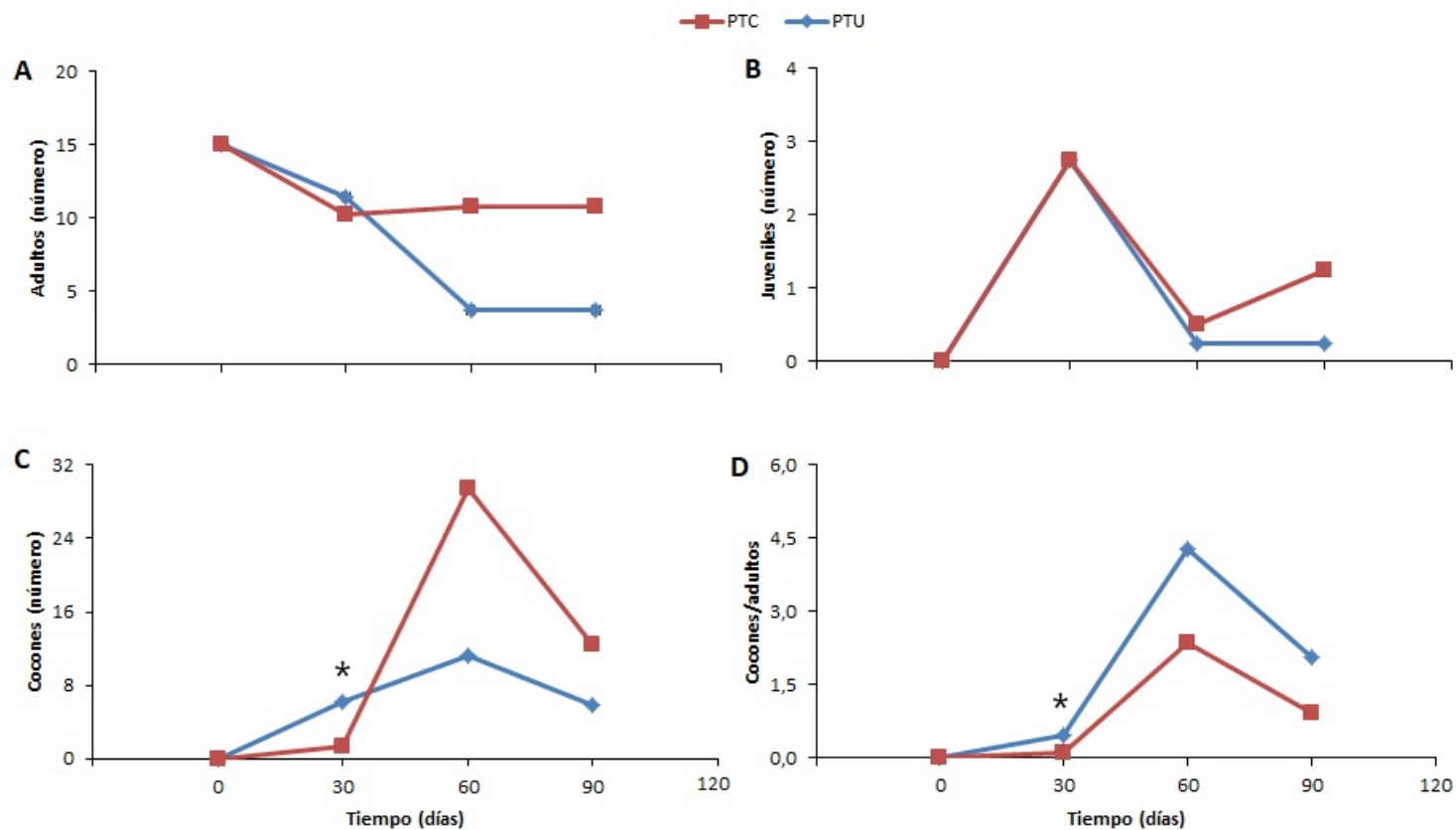


Fig. 15 - Cambios en el número de lombrices adultas (A), juveniles (B), cocones (C) y en la relación cocones por adulto (D) en el orujo de uva pre-tratado térmicamente y expuesto a compostar (PTC) o a transformar con *U. botrytis* LPSC 813 bajo FES (PTU) durante el proceso de vermicompostaje. Para cada tiempo, se indican con un asterisco diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Mann-Whitney U, $p < 0,05$).

En relación a la actividad deshidrogenasa, entre los tratamientos se vio que hubo diferencias al tiempo inicial, donde PTC mostró un mayor nivel de actividad deshidrogenasa ($87 \pm 3,1 \%$). En contraposición, a los 90 días de iniciado el vermicompostaje los niveles de actividad deshidrogenasa de PTU fueron superiores a los de PTC ($110,1 \pm 23,2 \%$; Fig. 16).

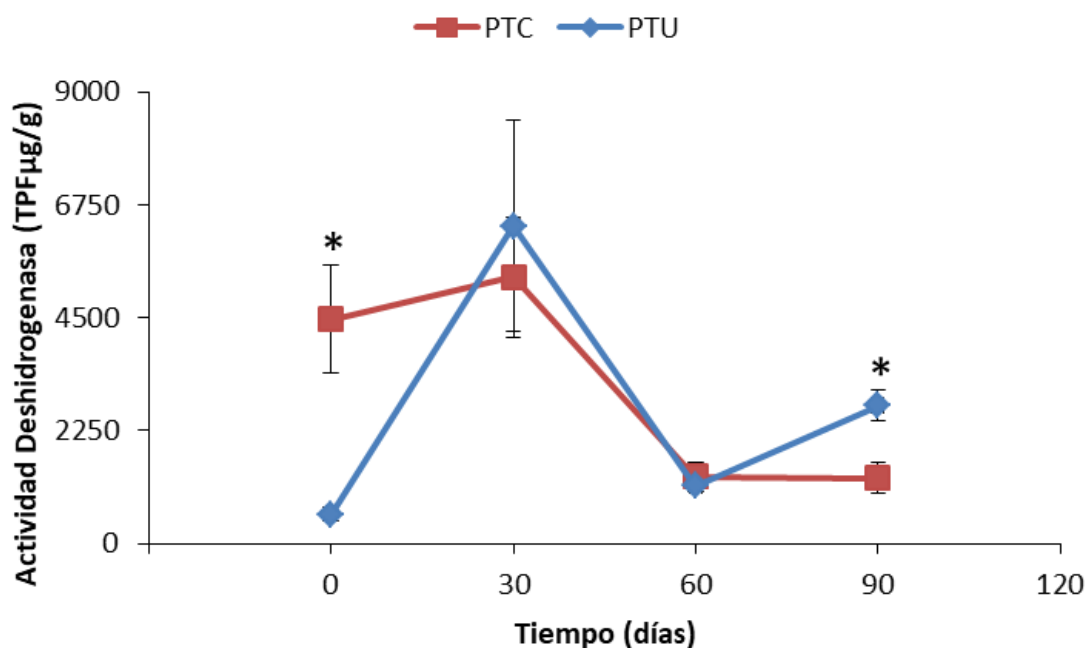


Fig. 16 - Cambios en los niveles de la actividad deshidrogenasa en la FSA del orujo de uva pre-tratado térmicamente y expuesto a compostar (PTC) o a transformar con *U. botrytis* LPSC 813 bajo FES (PTU) durante el proceso de vermicompostaje. Para cada tiempo, se indican con un asterisco diferencias significativas entre los tratamientos (Test de T, $p < 0,05$).

Cambios en la germinación, longitud radicular relativa y en el índice de germinación de semillas de lechuga embebidas con la FSA_{ps} del orujo pre-tratado bajo ambos bioprocesos se muestran en la figura 6. Mientras el porcentaje de germinación no presentó diferencias entre los tratamientos, la longitud radicular relativa varió en función al pre-tratamiento hasta los tres primeros tiempos de muestreo, solo siendo mayor para PTC al tiempo inicial; la situación se invirtió a los 30 y 60 días, cuando PTU mostró mayores valores (figuras 17-A y 17-B). Como muestra la figura 17-C, los pre-tratamientos repercutieron sobre el índice de germinación, destacándose el mayor índice a los 60 días en el PTU.

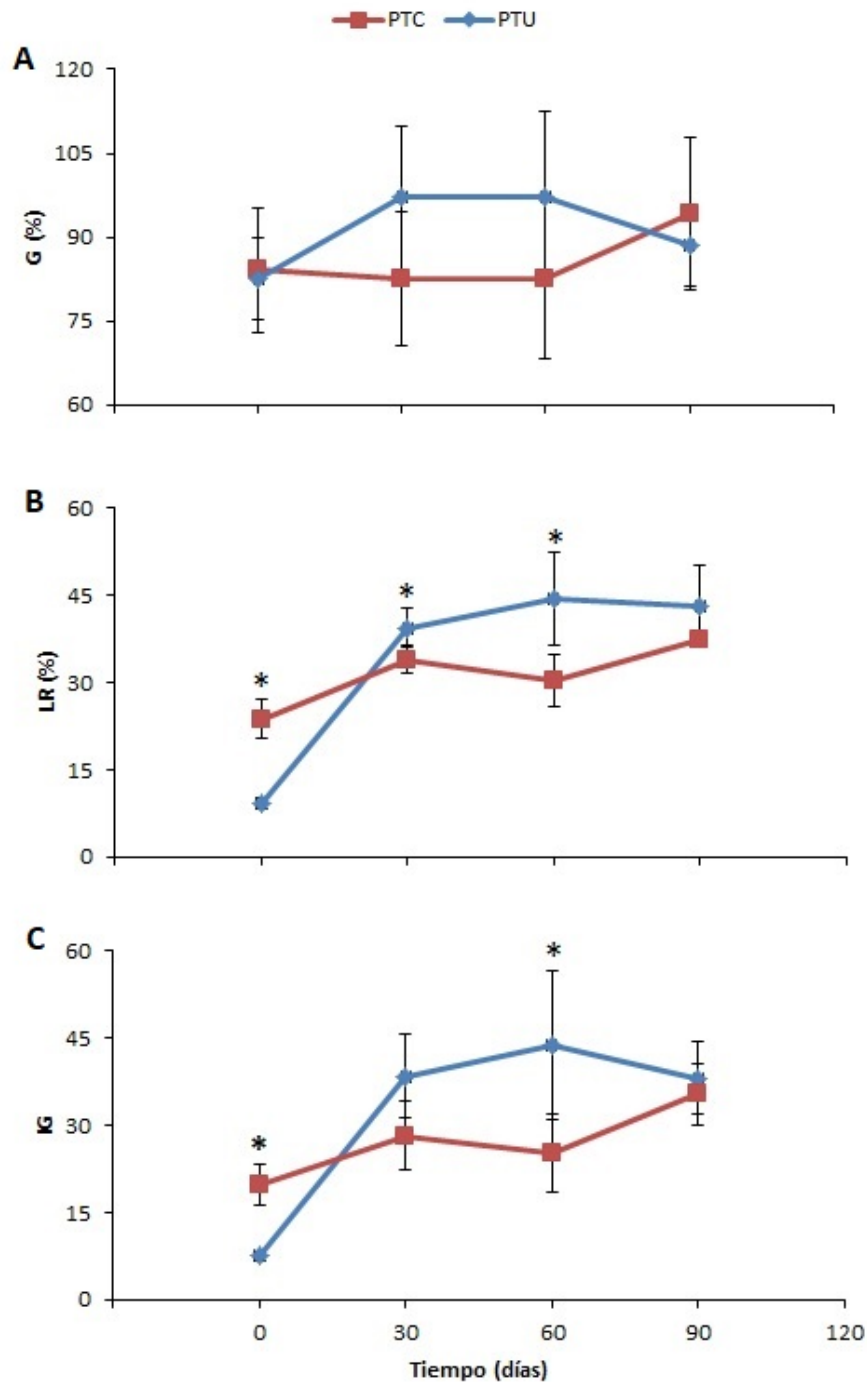


Fig. 17 - Cambios en la germinación (G; A), longitud radicular relativa (LR; B) y en el índice de germinación (IG; C) de semillas de lechuga embebidas con la FSA del orujo de uva pre-tratado térmicamente y expuesto a compostar (PTC) o a transformar con *U. botrytis* LPSC 813 bajo FES (PTU) durante el proceso de vermicompostaje. Para cada tiempo, se indican con un asterisco diferencias significativas entre los tratamientos (Test de T, $p < 0,05$).

A lo largo del proceso de vermicompostaje se observó la presencia de arañas, moscas, y fauna predadora de lombrices y cocones (ciempiés y milpiés) en ambos tratamientos (Fig. 18).



Fig. 18- Ejemplar de ciempiés (miriápodo) encontrado en una de las literas de vermicompostaje.

5 – DISCUSIÓN

Diferentes hongos saprófitos pueden tener un rol crucial en la transformación y detoxificación del orujo, revelando variaciones en la composición físico-química del mismo que podrían ser la causa de la tolerancia o resistencia de las lombrices para crecer sobre este subproducto vitivinícola. Cova et al. (2007) sostienen que los compuestos polifenólicos representan a la lombriz factores anti-nutricionales, al mismo tiempo que tienen efectos anti-reproductivos que interfieren en su biología. Por tal motivo, la reducción en el contenido de fenoles observada en este trabajo en la mayoría de los orujos tratados con los hongos puede ser considerada como una evidencia del beneficio de la actividad de algunos hongos evaluada para aprovechar el orujo de *V. labrusca* como sustrato para el vermicompostaje. *C. rigida*, *P. albobadia* y *P. sanguineus* fueron los más eficientes en la remoción de los fenoles del orujo, coincidiendo con lo reportado por Troncozo (2019). Otro de los requerimientos de un sustrato apto para el desarrollo de las lombrices es que presente un pH en el rango de 7,5 a 8 (Pellegrini et al., 2014). Por lo tanto, el tratamiento del orujo con *U. botrytis* resulta ser el más promisorio ya que logró invertir la situación de acidez inicial. La mayoría de los hongos requieren pH ácido para crecer y llevar a cabo sus variadas actividades metabólicas. En el caso de *U. botrytis* se ha reportado la existencia de un sistema enzimático celulolítico cuya actividad es óptima en el rango de 7-8 de pH (Saparrat et al., 2008). No obstante, independientemente del hongo empleado, la CE del orujo transformado con los hongos utilizados se mantuvo por debajo del límite recomendado para el desarrollo óptimo de las lombrices (CE < a 4 dS/m; Pellegrini et al., 2014). Otro factor determinante en el empleo del orujo como material de partida

para el vermicompostaje es el tamaño de partícula, puesto que cuando el material presenta valores entre 1 y 3 cm se facilita su consumo por las lombrices, así como el ataque del mismo por los microorganismos asociados en el proceso (Pellegrini et al., 2014). Excepto para el orujo tratado con *C. rigida*, el resto de los orujos tratados con los hongos presentaron un tamaño de partícula compatible para el proceso de vermicompostaje. No obstante, solo los orujos pre-tratados con *U. botrytis* y *C. rigida* resultaron ser los que mejor respondieron como hábitat para las lombrices. Sin embargo, no se puede establecer si alguno de los parámetros estudiados tuvo mayor relevancia en la permanencia de las lombrices sobre el orujo. Se ha reportado que las lombrices pueden incorporar a su dieta a los hongos (Bhat et al., 2017), esto por lo tanto puede hipotetizar que los micelios de *U. botrytis* y *C. rigida* podrían incrementar la palatabilidad del orujo, sumado a su capacidad para degradar o detoxificar sus componentes tóxicos y/o anti-nutricionales. A partir de este estudio se seleccionó el tratamiento del orujo con *U. botrytis*, que si bien presentó una menor reducción en el contenido de fenoles respecto a *C. rigida*, fue capaz de generar un sustrato cercano a la neutralidad y presentar un tamaño de partícula adecuado para el manejo del mismo y el vermicompostaje.

Durante el proceso de vermicompostaje se observaron algunas diferencias en la composición físico-química del orujo. Si bien el orujo pre-tratado con *U. botrytis* (PTU) presentó una menor concentración de fenoles solubles respecto al control (PTC), su evolución durante el proceso de vermicompostaje evaluado reveló que en ambos tratamientos el contenido de fenoles se redujo hasta alcanzar niveles equivalentes. Esto podría deberse tanto a la lixiviación de estas sustancias por el riego (lavado) como a la actividad microbiana del sistema. El incremento de amonio en ambos tratamientos durante los primeros 30 días podría estar relacionado a la actividad proteolítica y amonificadora de los microorganismos (García-Sánchez et al., 2017). Por otro lado, también la posterior reducción de esta fuente nitrogenada podría deberse a varios procesos como su inmovilización por microorganismos, su lixiviación, o volatilización (García-Sánchez et al., 2017). Asimismo, la reducción de la CE de PTU puede haber sido el resultado tanto por el lavado de las sales disponibles en la solución acuosa así como por su incorporación o su inmovilización por la microbiota del sustrato (Bhat et al., 2017; García-Sánchez et al., 2017).

Cuando se analizó la evolución de la carga de lombrices sobre ambos tratamientos, el número de adultos no superó a la inicialmente adicionada. Esto pudo haber sido producto de la propia competencia entre lombrices por una escasez de nutrientes o por su

baja digestibilidad (Das et al., 2016). Asimismo, la población de juveniles pudo haber sido afectada bajo estas condiciones, desencadenando probablemente la migración de lombrices y/o su muerte.

Analizando la carga de cocones, PTU no inhibió la actividad reproductiva de las lombrices, como sí sucedió con PTC en los primeros 30 días. Esto nos estaría sugiriendo que el acondicionamiento del orujo con *U. botrytis* 813, mejora las características del sustrato para la reproducción de las lombrices, en coincidencia con el incremento observado en la relación entre cocones e individuos adultos. Es conocido que bajo estrés nutricional o en sustratos con bajo nivel de nitrógeno, las lombrices pueden perder la funcionalidad de sus clitelios, ya sea por una regresión al su estadio juvenil o infertilidad de los mismos (Nogales et al., 1999). La presencia de organismos predadores también podrían ser causantes de la reducción tanto de cocones como de lombrices juveniles. Puesto que se encontraron estos invertebrados en las literas asociados a cada tratamiento, no se puede descartar su contribución en la pérdida de estos parámetros evaluados ajenos a los tratamientos planteados a evaluar en esta tesis.

Según lo reportado por Martínez-Cordeiro et al. (2013), existiría un aumento en la actividad microbiana del sustrato a partir del agregado de las lombrices, ya que tienen la particularidad de estimular el desarrollo microbiano por su acción excavadora, en respuesta a exponer compuestos biodegradables por los microorganismos, tal como lo observado en el incremento de la actividad deshidrogenasa a los 30 y 90 días para PTU. Resultados similares fueron reportados por García-Sánchez et al. (2017) usando orujo de uva (no especificada la especie de vid empleada), aunque ellos hallaron también aumentos en la población de lombrices. En cambio, el decrecimiento en la actividad deshidrogenasa hallado en los ensayos de esta tesis a los 60 días, iría en concordancia con lo reportado por Suthar & Singh (2008), quien afirmó que las lombrices se nutren preferentemente de los propios microorganismos del sustrato, generando la disminución en la microbiota.

El índice germinativo (IG) puede ser un indicador de la estabilidad y madurez del vermicompost debido a que combina la medición de la germinación de semillas y el crecimiento radicular (Zucconi et al., 1981; Bhat et al., 2017). Si bien en ambos tratamientos se observó un incremento en el IG, ninguno logró alcanzar el 80% de IG, siendo éste el valor de referencia para determinar la ausencia de sustancias fitotóxicas (Zucconi et al., 1981).

Si bien en base a todos estos resultados no se puede aún afirmar la obtención de un vermicompost apto para ser empleado como abono orgánico utilizando un pre-tratamiento con hongos saprótrofos específicos sobre el orujo de *V. labrusca*, existieron algunas diferencias que sugieren a ciertos hongos como prometedores en el acondicionamiento del sustrato para el vermicompostaje. En este sentido, el decrecimiento temprano de la población de lombrices no fue igual en PTU y PTC, lo cual estuvo acompañado por un mayor IG en PTU, infiriendo que este último tratamiento podría reducir la extensión de la fase activa de las lombrices comparada a PTC. Por lo tanto, futuros estudios son necesarios para confirmar si la utilización de orujo pre-tratado con *U. botrytis* bajo condiciones de FES es factible como un pre-tratamiento del orujo de *V. labrusca* para su empleo como material de partida para el vermicompostaje.

6 – CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos y el análisis realizado de los mismos, se puede concluir que:

- ❖ El orujo de *V. labrusca* var. *isabella*, que resulta de la producción del Vino de la Costa, no es un material de partida apto para el vermicompostaje, debido a su bajo pH y a la presencia de sustancias fenólicas que actúan como posibles factores de inhibición para las lombrices.
- ❖ El pre-tratamiento de orujo con los hongos *C. rigida*, *P. albobadia*, *T. harzianum* y *U. botrytis* bajo condiciones de FES incrementa la tolerancia de las lombrices frente a este sustrato.
- ❖ El pre-tratamiento del orujo con *U. botrytis* reduce el tiempo de fase activa en el vermicompostaje y constituye una estrategia prometedora de revalorización del orujo de *V. labrusca* para su empleo como material de partida para el vermicompostaje.

7 – BIBLIOGRAFIA

- Bhat, S.A., Singh, J., Vig, A.P., 2017. Earthworms as Organic Waste Managers and Biofertilizer Producers. *Waste and Biomass Valorization* 9, 1073–1086. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9899-8>
- 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>
- Chávez González, M.L., Rodríguez Durán, L.V., Rodríguez Herrera, R., Aguilar, C.N., 2009. Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido. *Cienc. Cierta* 20, 7–14.
- Cova, L.J., García, D.E., Castro, A.R., Medina, M.G., 2007. Efecto perjudicial de *Moringa oleifera* (Lam.) combinada con otros desechos agrícolas como sustratos para la lombriz roja (*Eisenia* spp.). *Interciencia* 32, 769–774.
- Das, D., Bhattacharyya, P., Ghosh, B.C., Banik, P., 2016. Bioconversion and biodynamics of *Eisenia foetida* in different organic wastes through microbially enriched vermiconversion technologies. *Ecol. Eng.* 86, 154–161.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.012>
- Dix, N.J., Webster, J., 1995. *Fungal Ecology*. Springer Netherlands.
- Doelle, H.W., Mitchell, D.A., Rolz, C.E., 1992. *Solid Substrate Cultivation*.
- 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>
- García-Sánchez, M., Taušnerová, H., Hanč, A., Tlustoš, P., 2017. Stabilization of different starting materials through vermicomposting in a continuous-feeding system: Changes in chemical and biological parameters. *Waste Manag.* 62, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.008>
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., Domínguez, J., 2011. Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *J. Hazard. Mater.* 187, 291–295.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.011>
- 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>
- Jurado, M., Martín, T., Martínez, M.J., Saparrat, M.C.N., 2011. Application of White-Rot Fungi in Transformation, Detoxification, or Revalorization of Agriculture Wastes: Role of Laccase in the Processes, Second Edition. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00398-6>
- King, G.A., Woollard, D.C., Irving, D.E., Borst, W.M., 1990. Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Physiol. Plant.* 80, 393–400.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb00058.x>

- Lindahl, B., Stenlid, J., Olsson, S., Finlay, R., 1999. Translocation of P-32 Between Interacting Mycelia of a Wood Decomposing Fungus and Ectomycorrhizal Fungi in Microcosm Systems. *New Phytol.* 144: 183–193. *New Phytol.* 144, 183–193.
- 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* 9, 55–63.
- 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>
- 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>
- Nogales, R., Elvira, C., Benítez, E., Thompson, R., Gomez, M., 1999. Feasibility of vermicomposting dairy biosolids using a modified system to avoid earthworm mortality. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 34, 151–169. <https://doi.org/10.1080/03601239909373189>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2001.00426.x>
- 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.
- Pandey, A., 1992. A. Pandey. “Recent process developments in solid–state fermentation”. *Process. Process Biochem.* 27, 109–117.
- Pellegrini, A., Lanfranco, J., Vacisek, A., Gelati, P., 2014. Capacitación para el reciclado de residuos orgánicos - Fuente de sustratos, abonos y acondicionadores de suelos degradados, Segunda edición. ed. La Plata.
- Rahardjo, Y.S.P., Tramper, J., Rinzema, A., 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.002>
- Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S., 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Saparrat, M.C.N., Femoselle, G.E., Stenglein, S.A., Aulicino, M.B., Balatti, P.A., 2009. *Pseudocercospora griseola* Causing Angular Leaf Spot on *Phaseolus vulgaris* Produces 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin. *Mycopathologia* 168, 41–47. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9194-8>
- 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., Rocca, M., Aulicino, M., Arambarri, A.M., Balatti, P.A., 2008. *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>
- Schuldt, M., Rumi, A., Gutierrez-Gregoric, D., 2005. Estimación de la capacidad de porte en lombricultivos de *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) con distintas materias orgánicas. *Rev. Arg. Prod. Anim.*
- 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>
- Suthar, S., Singh, S., 2008. Feasibility of vermicomposting in biostabilization of sludge from a distillery industry. *Sci. Total Environ.* 394, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.005>
- Thalman, A., 1968. Zur methodik der Bestimmung der Dehydrogenase activitat im Boden Mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch* 21, 249–258.
- Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., Hodgkiss, I.J., 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* 93, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00052-8)
- Toccalino, P.A., Agüero, M.C., Serebrinsky, C.A., Roux, J., 2004. Comportamiento reproductivo de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) según estación del año y tipo de alimentación. *Rev. Vet* 15, 65–69.
- Troncozo, M.I., 2019. Biotransformación de los residuos del vino de la costa de Berisso (provincia de Buenos Aires) por hongos saprótrofos.
- Velarde, I., Maggio, A., Otero, J., 2008. Sistemas Agroalimentarios Localizados en Argentina.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*, Fourth Ed. ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54–57.