

INGENIERIA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

Tesis de Grado

**Biorremediación de residuos sólidos
provenientes de la industria olivícola
con aplicación del hongo
basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius***

PSC2001

Tesista: Videla Yamile

Directora: Stela Maris da Silva

2020

Biorremediación de residuos sólidos provenientes de
la industria olivícola con aplicación del hongo
basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* PSC2001

AUTOR:

Videla Yamile Lourdes Solange
América, 7317
Lujan de Cuyo, Mendoza CP: 5507
videla.yami@gmail.com

DIRECTORA:

Doctora Stela Maris da Silva
Huarpes, 44 – Planta Baja
5ta Sección, Mendoza CP: 5500
sdasilva@fca.uncu.edu.ar

Miembros del Comité Evaluador

Ingeniero Agrónomo Juan Bustamante

Ingeniero en Recursos Naturales Renovables Mariano Iván Funes Pinter

Licenciada en Biología María Victoria Salomón

RESUMEN

El cuidado del ambiente es un tema importante para la Provincia de Mendoza, y sobre todo a la hora de cuidar los suelos ya que son delicados y de fácil degradación y los cultivos asociados a ellos. Por lo tanto, es importante que el volcado de residuos agroindustriales que son utilizados como abonos estén libres de contaminantes.

Hay diversas alternativas para el tratamiento de residuos. Una de ellas es la biorremediación, que consiste en la degradación o transformación de contaminantes peligrosos en compuestos menos tóxicos mediante procesos biológicos utilizando diferentes organismos. Uno de ellos que ha recibido atención debido a su alta capacidad para degradar diversidad de sustratos, son los hongos basidiomicetos. Se han utilizado diversas especies de hongos para analizar su acción en residuos de la industria olivícola y los resultados obtenidos han sido satisfactorios. Por lo tanto, en la presente tesina se optó por utilizar el hongo *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001, para aplicar una metodología sencilla que permita proporcionar un tratamiento a los residuos del proceso de producción del aceite de oliva, y además una correcta disposición final.

El estudio tuvo como objetivo evaluar el proceso de biorremediación del alperujo, residuo generado por el método de centrifugación de dos fases en la producción de aceite de oliva, mediante el uso del cultivo sólido del hongo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001. El tratamiento consistió en mezclar el medio de cultivo sólido del hongo y el alperujo en cajas de plástico durante un periodo de 60 días. Para evaluar el mismo, se realizó la medición de enzimas lacasas y manganeso peroxidasas como parámetro indirecto de desarrollo fúngico y además parámetros fisicoquímicos, orgánicos y biológicos como pH, materia orgánica, carbono orgánico, nitrógeno, potasio, fósforo, relación C:N y análisis ecotoxicológico. Además, se realizó una propuesta del tratamiento a escala piloto teórico utilizando como modelo la Fábrica experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Los resultados obtenidos nos muestran que el hongo *P. pulmonarius* PSC 2001 es capaz de crecer y desarrollarse en el alperujo, esto es verificado a través de los valores enzimáticos obtenidos de los análisis de las enzimas lacasas y manganeso peroxidasas como indicadores

indirectos del desarrollo fúngico. Se observó también una importante secreción enzimática especialmente de lacasas, lo que puede ser atribuido a las características del residuo utilizado. Una característica observada fue que el hongo alteró el pH del medio, manteniéndola en un rango ácido, siendo éste óptimo para su crecimiento.

Los resultados indicaron que hubo variación en los contenidos de materia orgánica, carbono orgánico y nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, al término del tratamiento fúngico del alperujo, habiendo cambios que dejan dichos nutrientes dentro de los parámetros recomendados por la FAO para abonos orgánicos. La relación C:N disminuyó en relación al control (residuo sin tratar) pero asimismo es necesario una corrección de ambos valores para que se encuadre en las recomendaciones de la FAO. Se observó que el tratamiento, a su término, ha resultado en una importante disminución de su ecotoxicidad, corroborado por el ensayo ecotoxicológico, validados por el porcentaje de germinación, disminuyendo así su ecotoxicidad.

Palabras clave: Alperujo, industria olivícola, hongos basidiomicetos, enzimas.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesina se realizó en el laboratorio BioPro en la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad de Cuyo. Mi principal agradecimiento es a mi directora Estela Maris Da Silva, una excelente mujer y profesional, quien aceptó ayudarme y guiarme a través de la realización de este trabajo y todos los desafíos que se presentaron.

A mi familia y amigos, que me apoyaron incondicionalmente en mi formación universitaria y personal.

A mis compañeros y futuros colegas, que llenaron este proceso de aprendizaje con buenos momentos y amistad, y que además recibí mucha ayuda en más de una ocasión.

A la cátedra de Dasonomía, que aceptaron que utilizara sus instalaciones e instrumentos para llevar a cabo este estudio.

A toda la gente que me acompañó de una forma u otra.

Contenido

Índice de figuras	VII
Índice de tablas.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aprovechamiento del alperujo.....	3
1.2 Tratamientos biológicos del alperujo	4
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	8
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo general.....	9
3.2 Objetivos particulares.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 Residuo	10
4.2 Microorganismos.....	10
4.3 Medio de manutención.....	11
4.4 Preparación del medio de cultivo sólido	12
4.5 Preparación del tratamiento	12
.....	13
4.6 Obtención del extracto	13
4.7 Metodología Analítica.....	14
4.7.1 Análisis de pH.....	14
4.7.2 Análisis de Enzimas.....	14

4.7.3 Análisis de fracciones orgánicas y nutrientes	15
4.7.4 Análisis ecotoxicológico	16
5. ANÁLISIS Y RESULTADOS	18
5.1 pH.....	18
5.2 Enzimas.....	20
5.2.1 Lacasas	20
5.2.2 Manganeso peroxidasas	24
5.3 Fracción orgánica y nutrientes	28
5.3.1 Materia orgánica	28
5.3.2 Carbono orgánico	29
5.3.3 Nutrientes	30
Nitrógeno	30
Fósforo	31
Potasio.....	32
5.3.4 Relación C: N.....	33
5.3.5 Análisis ecotoxicológico.	37
6. PROPUESTA DE TRATAMIENTO A ESCALA PILOTO.	41
7. CONCLUSIONES.....	44
8. RECOMENDACIONES.....	45
9. BIBLIOGRAFIA.....	46

Índice de figuras

Figura 1: Cajas de Petri con el hongo <i>P. pulmonarius</i> PSC 2001 con una semana de desarrollo a 28°C ± 2°C en medio de cultivo de agar y nutrientes básicos.	11
Figura 2: 2a y 2.b <i>P. pulmonarius</i> PSC 2001 en el medio de cultivo sólido aserrín de álamo a los 21 y 35 días de desarrollo, de izquierda a derecha, respectivamente.	12
Figura 3: 3a y 3b Preparación de las cajas para el tratamiento biológico. En 3a se observa el pesaje del cultivo solido de <i>Pleurotus pulmonarius</i> y 3b, corresponde el pesaje del residuo olivícola.....	13
Figura 4: Semillas con raíces germinadas (a) y sustratos preparados (b).....	17
Figura 5: índice de germinación según Zucconi y col. (1981).....	17
Figura 6: Valores de pH durante el tratamiento y control a los 7,15, 21, 30, 45 y 60 días.	18
Figura 7: 7a control a los 60 días. 7b tratamiento 1 a los 60 días.....	20
Figura 8: Tratamiento 3 (8a) y tratamiento 2 (8b) a los 60 dias de cultivo del hongo <i>P. pulmonarius</i>	21
Figura 9: Actividad enzimática de lacasas en U/g obtenidas de los extractos enzimáticos....	22
Figura 10: Actividad enzimática de manganeso peroxidasas en U/g obtenidas de los extractos enzimáticos.....	25
Figura 11: Variación del contenido de MO en el residuo luego de 60 dias.	28
Figura 12: Variación del contenido de CO del residuo luego de 60 dias de tratamiento.	29
Figura 13: Variación del porcentaje de nitrógeno.	30
Figura 14: Variación del porcentaje de fósforo	31

Figura 15: Variación en el porcentaje de potasio	32
Figura 16: Basidiocarpos (cuerpos de fructificación) formados en caja 2 (16a) y caja 3 (16b)	36
Figura 17: Relación C: N de residuo al día cero y luego de su tratamiento con <i>P. pulmonarius</i> a los 60 días.	33
Figura 18: Porcentaje de germinación para cada sustrato.	37
Figura 19: 19a Sustrato de tierra fértil con hojas germinadas y 19b alperujo no tratado sin germinación de hojas de semillas de <i>lactuca sativa</i>	38
Figura 20: 20a alperujo tratado con hojas germinadas y 20b alperujo más tierra fértil con hoja germinada de <i>lactuca sativa</i>	38
Figura 21: Alperujo tratado más tierra fértil con hojas germinadas de <i>lactuca sativa</i>	39
Figura 22: Pileta de tratamiento a escala piloto de alperujo con <i>P. pulmonarius</i> PSC 2001 ..	42

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Pleurotus pulmonarius</i>	10
Tabla 2: Metodologías empleadas por el laboratorio de Química Agrícola en los análisis de las fracciones orgánicas en el post tratamiento.	15
Tabla 3: Contenido de cada sustrato y denominación.....	16
Tabla 4: Valores máximos obtenidos de U/g de enzima lacasas para un tiempo fermentativo de 21 días en diferentes sustratos.	23
Tabla 5: Valores de enzima Mn- peroxidasa producidos por <i>P. pulmonarius</i> para dos sustratos diferentes.....	26
Tabla 6: Sugerencia de parámetros para abonos.	36

1. INTRODUCCIÓN

La producción de aceite de oliva comenzó hace miles de años en la cultura mediterránea, y resultado de la colonización española, el cultivo del olivo y la generación de aceite se expandió en Sudamérica también. Actualmente, los principales países productores de aceite de oliva se encuentran concentrados en la zona del mediterráneo y en América del Sur. Estos países son España, Portugal, Grecia, Italia, Túnez, Turquía, Marruecos y Argentina. Según el Consejo Olivícola Internacional (COI, 2018) este grupo de países produce aproximadamente el 90% del aceite de oliva que se produce actualmente en el mundo. Teniendo en cuenta la producción en toneladas de aceite de oliva, se considera a los principales fabricantes a la Unión Europea con una cifra de 2.186.000 tn.

En los últimos años, Argentina ha sido uno de los principales productores de aceite de oliva y oliva de mesa, convirtiéndose en el principal productor y exportador de América. Cuenta con una superficie de 90.000 ha de tierra implantada con olivo. Según la Secretaria de Política Económica (2018), del total de producción, las provincias con mayor superficie son La Rioja, Catamarca, Mendoza y San Juan, aunque también existen plantaciones de olivo en Córdoba, Buenos Aires y Salta. El 75% corresponde a plantaciones con destino aceite. Teniendo Catamarca: 15.840 ha.; La Rioja: 26.010 ha.; Mendoza: 21.420 ha. y San Juan: 18.990 ha.

En Mendoza se encuentran registradas alrededor de 138 empresas olivícolas que están distribuidas principalmente en el Gran Mendoza con un 62% y en los departamentos de San Martín, Rivadavia y Junín que concentran el 21%. El resto se encuentran distribuidas en los departamentos del norte y sur de nuestra provincia. Del total de fábricas dedicadas a la elaboración de productos derivados de las aceitunas; 25 de ellas elaboran sólo aceite de oliva, 94 producen exclusivamente aceitunas en conserva y 19 industrias elaboran ambos productos. Las fábricas inscriptas en Mendoza que se dedican a la industrialización de aceitunas se dividen en tres grupos de acuerdo con el destino que le dan a la materia prima. Así, 94 firmas realizan la preparación de conservas, 25 se dedican a la elaboración de aceites y 19 son mixtas, dado que efectúan ambos procesos (Cáceres, et al; 2009).

Según el Centro de Actividades Regionales para la Producción Limpia (CAR/PL, 2000) la etapa de extracción o separación de las fases grasa (aceite), sólida (orujo) y acuosa (alpechín) puede realizarse con diferentes métodos:

- Sistema de producción tradicional o de prensas: Consiste en el prensado de la pasta mediante prensas hidráulicas. Es un sistema discontinuo por la necesidad de proceder según ciclos de prensas secuenciales. El resultado del proceso es el aceite, el alpechín y orujo.
- Sistema continuo de tres fases: se utiliza una centrífuga horizontal denominada “decanter” permitiendo la separación del aceite y de la pasta por centrifugación continua. El resultado del proceso es el aceite, el alpechín y el orujo.
- Sistema continuo de dos fases: Es una variante de la anterior, en el cual la centrífuga “decanter” separa el aceite, y mezcla el orujo con el alpechín en una sola fase denominada alperujo.

Se estima que por cada 1000 kg de aceitunas que ingresan a la planta extractora se generan 850 kg de alperujo, si éstas son procesadas mediante tecnologías de dos fases, o 550 kg de orujo y 1m³ de alpechín, si son procesadas por prensado o centrifugación por tres fases (Roig et al., 2006; Morillo et al., 2009).

Según Albuquerque et al. (2004), el alperujo es un residuo sólido lignocelulósico, de naturaleza recalcitrante. La materia orgánica de este residuo está constituida mayoritariamente por lignina, celulosa y hemicelulosa. Otros constituyentes orgánicos importantes son las grasas, carbohidratos solubles y proteínas. Además de ello, el alperujo es un material con elevado potencial fitotóxico y antimicrobiano debido fundamentalmente a su gran contenido en polifenoles (Benítez et al., 2005).

1.1 Aprovechamiento del alperujo

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

1.1.1 Extracción del aceite de orujo

Los orujos son sometidos a una segunda extracción para obtención de aceites de orujo de oliva mediante disolventes químicos, en general hexano. Esta operación se realiza en las extractoras que generalmente están en un lugar distinto a la ubicación de la propia almazara. El subproducto resultante es el alperujo seco y extractado u orujillo en el que el porcentaje de aceites muy bajo y presenta una humedad del 10-13% (Alvarado, 2008)

1.1.2 Productos de valor añadido

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

1.1.3 Energía térmica y eléctrica

El alperujo seco y extractado se puede utilizar como combustible para la cogeneración de energía eléctrica y térmica por combustión ya que presenta un poder calorífico de 4.400 kcal/kg (Masghouni y Hassairi, 2000, Caputo et al., 2003). El inconveniente de este aprovechamiento del alperujo es la alta producción de cenizas como residuo último de la combustión.

1.1.4 Abono orgánico

El alperujo se puede utilizar como abono de suelos agrícolas por su alto contenido en materia orgánica y presencia de micronutrientes. Este residuo es rico en fósforo lo que provoca una mejor incorporación al suelo de este elemento que en el caso de utilizarse fertilizantes minerales (Barreto et al., 2000). Además tiene una alta proporción C/N que provoca una reacción de demanda de N del cultivo que se puede corregir adicionando una fuente externa del mismo (Ordoñez et al., 1999; Cabrera et al., 2002) Sin embargo, debido a los niveles elevados de fenoles del alperujo que originan síntomas de fitotoxicidad en los cultivos, ya que el uso directo de este en el suelo tiene un efecto perjudicial en la estabilidad estructural del mismo, se opta por el tratamiento de dicho residuo antes de su uso para eliminar su toxicidad (Ruiz et al., 1997).

1.1.5 Otras aplicaciones

Según Martín et al. (2003), los orujos secos y extractados son materiales lignocelulósicos y su utilización como fuente de nutrientes para rumiantes puede estar limitada por la presencia de los compuestos fenólicos, pero puede solucionarse con la utilización de agentes bloqueantes como el polietilenglicol (PEG), la suplementación con nitrógeno o su utilización por especies de rumiantes con baja sensibilidad a la presencia de estos compuestos como, es el caso del caprino y ovino. Sin embargo, dada la alta proporción de fibras poco digeribles y el bajo contenido en proteínas, se recomienda la aplicación de un suplemento proteico (Martín-García et al., 2004).

1.2 Tratamientos biológicos del alperujo

Según diversos autores como Filippin et al., 2012; Tortosa et al., (2012); Varnero et al, (2011) se puede tratar el alperujo en diferentes procesos:

1.2.1 Compostaje y generación de biogás

La estabilización del "alperujo" mediante procesos de compostaje es una técnica bien conocida que permite convertir este residuo, en una enmienda para su uso como fertilizante orgánico (Alburquerque et al, 2006 y 2007; Cegarra et al.,2006; Filippin et al., 2012; Tortosa et al., 2012;

Varnero et al, 2011). Las experiencias realizadas que utilizan digestión anaerobia son escasas (Borja et al., 2006; Roig et al., 2006; Rincón y Borja, 2012) y casi inexistente, la que usa acoplamiento sucesivo de ambos métodos, anaeróbico y aeróbico, para producir biogás y un residuo orgánico estable y maduro para uso agrícola. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el alperujo presenta compuestos aromáticos, como fenoles, y ácidos grasos de largas cadenas que pueden ser tóxicos para las bacterias metanogénicas, afectando el proceso de digestión anaeróbica que reduce los contenidos de materia orgánica en los residuos, produciendo así biogás (Blika et al, 2009). Es por ello, que es necesario evaluar un pre-tratamiento que elimine dichos compuestos, como la dilución de sólidos o la utilización de microorganismos que degraden previamente el residuo, disminuyendo la toxicidad para las bacterias metanogénicas.

1.2.2 Aplicación de Hongos en el tratamiento biológico del alperujo

Los hongos son organismos versátiles capaces de sobrevivir en condiciones ambientales adversas y suelen poseer la habilidad para degradar sustancias complejas. Entre ellos se encuentran los hongos lignocelulolíticos, capaces de degradar la lignocelulosa a fragmentos de menor tamaño o incluso llevarla a un proceso de mineralización (Steffen et. al., 2007).

Entre los hongos lignocelulósicos, se destacan los hongos basidiomicetos del género *Pleurotus*. Estos hongos se caracterizan por su capacidad de degradar los diferentes polímeros de la lignocelulosa, por lo que el sustrato para su cultivo está basado en materiales lignocelulósicos (Mata et al., 2017; Picornell et al., 2017). El hongo *Pleurotus pulmonarius* pertenece a la Familia Pleurotaceae dentro del Orden Agaricales de la Clase Basidiomicetes en el Filo Basidiomicota (Lechner, 2002). De acuerdo con Wahab et al. (2014), esta especie presenta una amplia adaptabilidad y facilidad de ser cultivado, ya que el mismo se desarrolla en un amplio intervalo de temperaturas como de sustratos. La capacidad de degradación de compuestos lignocelulósicos está asociado a la liberación de enzimas extracelulares con baja especificidad de sustrato, esto les confiere la habilidad para crecer sobre una amplia diversidad de materiales (Adenipekun y Lawal, 2011). Las materias primas de base utilizadas en la elaboración de sustratos abarcan materiales como restos de cultivos, subproductos derivados de agroindustrias,

desechos agrícolas, residuos agroindustriales, etc (Picornell et al., 2017). Entre las enzimas que produce se encuentran las lacasas, las enzimas manganeso peroxidadas y la peroxidasa versátil (Mkhize et al., 2017). Según Hofmockel et al. (2007), las enzimas extracelulares secretadas tienen la capacidad de despolimerizar la lignina por oxidación de los residuos fenólicos y liberar la celulosa para su degradación por el complejo de celulasas.

Las enzimas permiten al hongo realizar sus funciones básicas de crecimiento y fructificación ya que degradan polímeros en compuestos de bajo peso molecular y de fácil absorción (Mata et al., 2017). La medición de las actividades enzimáticas son de importancia ya que sirven como un parámetro indirecto del desarrollo fúngico, ya que se sabe que la producción de las enzimas aumenta en paralelo con el crecimiento de la biomasa del hongo (Koutrotsios y Zervakis, 2014).

Las enzimas lacasas que produce *P. pulmonarius*, son las enzimas que permiten que el hongo tenga una rápida adaptación al sustrato y favorecen la competencia con otros microorganismos (Salmones y Mata, 2005). Las enzimas manganeso peroxidadas son capaces de degradar tanto la lignina como derivados de la misma y la peroxidasa versátil tiene la capacidad de degradar hidroquinonas. A su vez, tanto las lacasas como la peroxidasa versátil pueden degradar compuestos aromáticos y colorantes (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006). Estas enzimas tienen como característica reaccionar con sustratos de estructuras químicas muy diversas, lo que ha permitido que sean aplicadas en diversos procesos industriales, en biorremediación para la degradación de xenobióticos, para la transformación e inactivación de contaminantes tóxicos, para la producción de biocombustibles e incluso, para síntesis orgánica y para el refinamiento de derivados del petróleo (Márquez-Araque et al., 2007; Alves García et al., 2007).

Biodegradación de Alperujo con hongos basidiomicetos

Se sabe que los hongos lignocelulolíticos son capaces de degradar los compuestos fenólicos presentes en el alperujo. El tratamiento con hongos lignocelulolíticos es una forma de tratamiento biológico que es factible de utilizar, para el residuo de alperujo, los trabajos de González Saavedra (2007) y Rios et al. (2002), demuestran a través de sus resultados, que estos basidiomicetos

crecen con éxito en sustratos de alperujo y alpechín provenientes de la industria del aceite de oliva.

Según González Saavedra (2007) se pudo realizar un tratamiento del alperujo utilizando el basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (hongo saprofito o parásito débil, descomponedor de madera) al cual previamente se le realizó vermicompostaje con *Eisenia foetida*. En ese trabajo se postuló la biodegradación por *E. foetida* y, posteriormente, *P. ostreatus* como proceso de reciclado del alperujo generado durante la extracción del aceite de oliva mediante centrifugación por dos fases. Este proceso biotecnológico, que todavía no ha sido escalado a una etapa productiva, tiene un bajo coste económico y permite la valorización del alperujo como enmienda orgánica del suelo.

Un trabajo realizado por Rios et al. (2002) llegan a la conclusión de que los experimentos realizados verificaron la capacidad de *P. ostreatus* para sobrevivir y crecer en OMW (olive mill waste, residuos de la aceituna), que no está diluido y no está completamente esterilizado. La capacidad del hongo para crecer fue probada y comprobada en cultivos sólidos y líquidos, llevada a cabo utilizando OMW sin adición de cualquier nutriente. Los resultados experimentales mostraron que el basidiomiceto eliminó los fenoles del medio de cultivo, en todas las diferentes condiciones examinadas.

Por lo planteado, se ha decidido emplear el hongo basidiomiceto *Pleurotus pulmonaris* en el tratamiento del residuo sólido del proceso olivícola (alperujo), en condiciones de ausencia de esterilización de dicho residuo, para futuro escalado de producción y aplicación de la metodología a desarrollar en la presente tesina. Se buscará evaluar la capacidad de reducción de la toxicidad para implementar un proceso de biorremediación eficaz y que sea de aplicación sencilla y escalable, con una reducción mínima de costos haciéndola económicamente viable para volúmenes mayores del residuo.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El método de tratamiento biológico basado en un cultivo sólido del hongo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* PSC2001 genera la disminución de la fitotoxicidad del residuo de la industria olivícola y mejora sus características físicas, químicas y biológicas, habilitándolo para ser aplicado como abono o mejorador de suelos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Implementar una metodología que permita la aplicación del hongo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 en el proceso de biorremediación de residuos sólidos provenientes de la industria olivícola.

3.2 Objetivos particulares

- 3.2.1 Caracterizar el residuo sólido proveniente de la industria olivícola en las diferentes etapas del proceso de biorremediación empleando para tal la determinación de parámetros físicos, químicos y biológicos del proceso.
- 3.2.2 Disminuir la fitotoxicidad del residuo sólido olivícola, por medio del tratamiento de biorremediación con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001.
- 3.2.3 Cuantificar el crecimiento del basidiomiceto, tomando como parámetros indirectos de la actividad fúngica, la producción de enzimas lacasas y manganeso peroxidasas.
- 3.2.4 Analizar los resultados obtenidos, teniendo como criterio la evaluación de la viabilidad de empleo del residuo tratado como mejorador de suelo y/o abono.
- 3.2.5 Presentar un escalado teórico de un tratamiento piloto de alperujo, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en la presente tesina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Residuo

El alperujo utilizado fue obtenido de una industria olivícola local de Mendoza. Fue originado dentro de un sistema de dos fases de producción olivícola en el año 2017, y empleado como material para los ensayos planteados en el siguiente trabajo.

4.2 Microorganismos

Se empleó en los ensayos el hongo *Pleurotus pulmonarius* (PSC 2001), La cepa fue aislada de *Pinus elliotii* y es propia del Laboratorio BIOPRO, ubicado en las instalaciones provisorias del Parque Biotecnológico de la UNCuyo en la Facultad de Ciencias Agrarias. A continuación, en la **Tabla 1**, se muestra la clasificación taxonómica actualizada de la especie *Pleurotus pulmonarius*.

TABLA 1: CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *PLEUROTUS PULMONARIUS*

Filo	Basidiomycota
Clase	Basidiomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	Pleurotus
Especie	<i>Pleurotus pulmonarius</i>

Fuente: Kuo, 2017.

4.3 Medio de manutención

Para el cultivo de *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 en cajas de Petri, se preparó en un erlenmeyer de 250 mL un medio básico de agar. Se le agregó agua destilada hasta completar los 150 mL y se mezcló la solución. Se esterilizó en autoclave a una presión de 1,5 atm durante 15 minutos. La formulación del medio de cultivo se encuentra protegida por la patente N° 0702645-5 emitida por el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INPI-Brasil)

Posteriormente se procedió a la inoculación del hongo en las cajas de Petri con el agar enfriado bajo campana. Luego se llevó a estufa, para crecimiento, a una temperatura de 25°C – 27°C durante una semana (**Figura 1**). A partir del hongo crecido en caja de Petri, se hizo el inóculo de hongo proveniente de los repiques realizados en caja de Petri, en los medios sólidos conteniendo aserrín de álamo, se pusieron en estufa a una temperatura entre 25°C – 28°C por aproximadamente 30 días para posteriores análisis enzimáticos.



FIGURA 1: CAJAS DE PETRI CON EL HONGO *P. PULMONARIUS* PSC 2001 CON UNA SEMANA DE DESARROLLO A 28°C ± 2°C EN MEDIO DE CULTIVO DE AGAR Y NUTRIENTES BÁSICOS.

4.4 Preparación del medio de cultivo sólido

Se acondicionaron en bolsas de polipropileno 94 g del residuo lignocelulósico (aserrín de álamo) con agregado de agua hasta humedad de 66% (ausencia de agua libre) y nutrientes básicos, y con peso final de cada bolsa de 100 g. Estas bolsas se llevaron al autoclave para esterilización a 1,2 atm por 30 min. Posteriormente se inocularon dichas bolsas (a partir de los cultivos previos en cajas de Petri), con el hongo *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 y se llevaron a estufa a 28°C ±2°C durante un período de 30 días. La formulación del medio de cultivo sólido se encuentra protegida por la patente N° 0702645-5 emitida por el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INPI-Brasil).

En la **Figura 2a** podemos observar el hongo *P. pulmonaris* en las bolsas de cultivo a los 21 días de desarrollo y en la **2b** a los 35 días de desarrollo, con un completo crecimiento micelial.



FIGURA 2: 2A Y 2.B *P. PULMONARIUS* PSC 2001 EN EL MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO ASERRÍN DE ÁLAMO A LOS 21 Y 35 DÍAS DE DESARROLLO, DE IZQUIERDA A DERECHA, RESPECTIVAMENTE.

4.5 Preparación del tratamiento

En cuatro cajas de plástico de 50L de capacidad se realizó el tratamiento del residuo. Tres cajas poseían la mezcla de 5 kg de alperujo con 2,5 kg de *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 previamente cultivado en bolsas de propileno con aserrín de álamo (**Figura 3a y 3b**), para la

mezcla se utilizaron 25 bolsas de inóculo aproximadamente. La cuarta fue destinada a control con solo 5 kg de alperujo. Las cuatro cajas fueron tapadas y envueltas en bolsas de residuo de polietileno para aislar la luminosidad y simular una situación similar a la aplicación del tratamiento en piletas.

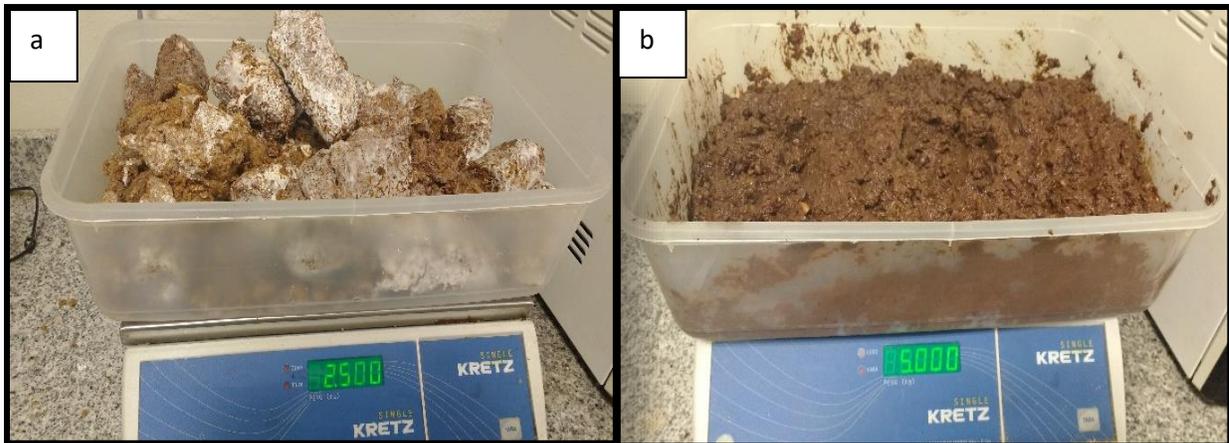


FIGURA 3: 3A Y 3B PREPARACIÓN DE LAS CAJAS PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO. EN 3A SE OBSERVA EL PESAJE DEL CULTIVO SOLIDO DE *PLEUROTUS PULMONARIUS* Y 3B, CORRESPONDE EL PESAJE DEL RESIDUO OLIVÍCOLA.

4.6 Obtención del extracto

Para los días 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días del tratamiento se procedió a la toma de una muestra de 50 mL del residuo de cada caja, tomando a las cajas 1, 2 y 3 como repeticiones del tratamiento y, además, de la caja control y se lo mezclaba con 50 mL de agua destilada. Las muestras obtenidas se filtraron con el uso de papel de filtro y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos para la obtención del extracto enzimático.

A partir del extracto enzimático se realizaron las mediciones de pH y de las enzimas lacasas y manganeso peroxidasas.

4.7 Metodología Analítica

4.7.1 Análisis de pH

Se realizó la medición del pH de los extractos enzimáticos con un pH-metro Ultra Basic Benchtop previamente calibrado.

4.7.2 Análisis de Enzimas

Se determinaron las concentraciones de las enzimas Lacasas y Mn-peroxidasas, en ambos casos se utilizó el espectrofotómetro Shimadzu UVMini- 1420. Para ambas enzimas se realizó el análisis estadístico de la varianza.

4.7.2.1 Lacasas: la determinación de la concentración de lacasas se obtiene a través de la aplicación del método de Wolfenden & Wilson, (1982). En dicho proceso se mide el cambio de absorbancia que se asocia a la cinética de reacción de las enzimas en consecuencia de la oxidación del sustrato ABTS [ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] en espectrofotómetro. Para la lectura se colocó en una cubeta 1mL de muestra, 1mL de buffer acetato de sodio 0,2M pH 5 y 0,2mL de ABTS. La lectura se realizó en el espectrofotómetro UV-Vis a 420 nm. Se obtiene por cinética de 90 segundos a 25°C, el intervalo de lectura es de 5 segundos.

Según los datos obtenidos se realizó lo establecido en la metodología mencionada, el cálculo de la actividad enzimática en U/g. Se expresa en la unidad internacional (U) definida como la cantidad de enzima que oxida 1 micromol de sustrato por minuto (Loi et al., 2016).

4.7.2.2 Mn-peroxidasas (MnP): la determinación de la concentración de MnP, se obtiene a través de la aplicación del método de Kuwahara et al., (1984). En dicho proceso se mide el cambio de absorbancia que se asocia a la oxidación del sustrato rojo fenol. Se utiliza un mix de reactivos que incluyen rojo de fenol, lactato de sodio, albúmina bovina, sulfato de

manganeso, y peróxido de hidrógeno. Para la lectura se colocó en una cubeta 0,5 mL de muestra, 1 mL de buffer succinato de sodio mM pH 4,5 y 0,5 mL del mix de reactivos. Se tienen dos grupos de muestras, los blancos y los que se le realizan baño maría a 30°C por 5 minutos. Se efectúa la lectura en el espectrofotómetro UV-Vis a 610 nm. Según los datos obtenidos se realizó lo establecido en la metodología mencionada, el cálculo de la actividad enzimática en U/g.

4.7.3 Análisis de fracciones orgánicas y nutrientes

Se tomaron 500 g del tratamiento y control al día 60, y además se llevó 500 g del residuo al día cero. Éstas fueron llevadas al laboratorio de la cátedra de Química Agrícola. Los análisis que se realizaron fueron: N totales- P totales- K totales - Materia Orgánica - Relación C/N y humedad. La metodología utilizada para los análisis son los especificados por el laboratorio y se encuentran en la **Tabla 2**. Además, se realizó el análisis estadístico de la varianza.

TABLA 2: METODOLOGÍAS EMPLEADAS POR EL LABORATORIO DE QUÍMICA AGRÍCOLA EN LOS ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES ORGÁNICAS EN EL POST TRATAMIENTO.

Análisis	Método
N total	Kjeldahl modificado. Cálculo realizado con la humedad que presentaba la muestra
P total	colorimétrico con nitro vanado molíbdico a partir de extracto clorhídrico. Cálculo realizado considerando la muestra con 0% de agua
K total	fotometría de llama a partir de extracto clorhídrico. Cálculo realizado considerando la muestra con 0% de agua
Materia Orgánica	calcinación – 58% MO se considera C. Cálculo realizado con la humedad que presentaba la muestra

4.7.4 Análisis ecotoxicológico

Para analizar el efecto fitotóxico del residuo, posterior al tratamiento con *P. pulmonarius*, se hizo una adaptación de la norma EPA/600/40-90/027F de ensayos ecotoxicológicos. El siguiente análisis se hizo de forma descriptiva y exploratoria.

En una primera etapa se produjo la germinación de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) en un germinador, como se muestra en la **Figura 4a**, para evaluar la viabilidad. Posteriormente, en tapas de cajas de Petri se prepararon cinco sustratos diferentes y se designaron como en la siguiente tabla.

TABLA 3: CONTENIDO DE CADA SUSTRATO Y DENOMINACIÓN.

Sustrato	Contenido	Siglas
1	Tierra fértil	TF
2	Alperujo no tratado	ANT
3	Alperujo tratado con <i>Pleurotus pulmonarius</i>	ATP
4	Tierra fértil con alperujo no tratado	TF+ANT
5	Tierra fértil con alperujo tratado con <i>Pleurotus pulmonarius</i>	TF+ATP

Se colocaron diez semillas germinadas con raíces en cada sustrato, como puede observarse en las **Figuras 4a** y **4b**. Se las regó y luego de 5 días, se contó la cantidad de semillas que emitieron sus plántulas.



FIGURA 4: SEMILLAS GERMINADAS (A) Y SUSTRATOS PREPARADOS (B).

Para el recuento de plántulas emergidas se utilizó, de acuerdo con la metodología descrita por Zucconi y col. (1981) modificada en la presente tesina. El porcentaje de germinación (%G) se determina de acuerdo con la siguiente expresión que se muestra en la **Figura 5**:

$$\% \text{ Germinacion } n = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas (extracto)}}{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas (control)}} \times 100$$

FIGURA 5: ÍNDICE DE GERMINACIÓN SEGÚN ZUCCONI Y COL. (1981)

5. ANÁLISIS Y RESULTADOS

5.1 pH

A continuación, se muestran los resultados de pH analizados según la metodología mencionada.

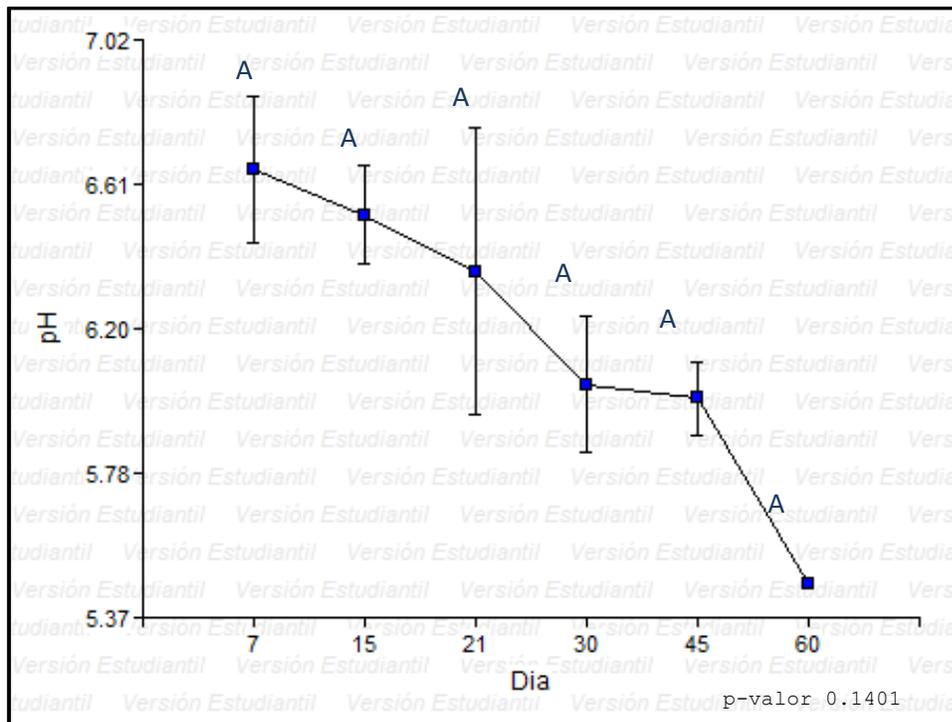


FIGURA 6: VALORES DE PH DURANTE EL TRATAMIENTO Y CONTROL A LOS 7,15, 21, 30, 45 Y 60 DÍAS.

De acuerdo con lo plasmado en la **Figura 6**, se observan los valores que toma el pH en los diferentes días que se trascurre el tratamiento. El análisis estadístico de la varianza, indica que, para un nivel de significancia de 0,05 la muestra no aporta evidencia de que existen diferencias significativas del valor del pH entre los diferentes días del tratamiento con el hongo.

Se observa que, al terminar el periodo de tratamiento, los valores del pH presentan una pequeña disminución hasta los 5,47. El valor de pH de la caja control fue de 6,9 al final del tratamiento, esto podría indicar que la presencia del hongo genera una disminución del pH a lo largo del tiempo.

En una investigación de Gloria et al., (2005), donde se realizó la degradación de desechos de cosecha cañera con hongos del género *Pleurotus*, se detectó que en el residuo fermentado hubo una disminución en el pH del sustrato hasta los 5,30 con respecto al residuo no transformado, a los 60 días de cultivo. Una disminución en el pH del sustrato con respecto residuo inicial, es el resultado del crecimiento del hongo y de una directa correlación con la actividad degradativa del microorganismo.

En su trabajo Koutrotsios & Zervakis, (2014), analizaron el comportamiento de varias especies de hongos basidiomicetos en la biorremediación del residuo proveniente de la industria olivícola, alpechín. El ensayo consistió en el cultivo de distintas especies de hongos basidiomicetos durante 30 días en condiciones estacionarias de temperatura en 100 mL de alpechín previamente esterilizado. A la hora de analizarse el pH, se demostró que, en todos los casos, éste presentaba una disminución debido al crecimiento micelial de los hongos basidiomicetos. En el trabajo, específicamente *P. pulmonarius* produjo una disminución del pH en el proceso de remediación, hasta de 5,44, mientras que los ensayos controles no presentaron ninguna variación.

En su trabajo Frattini (2019), donde realizó la degradación de alperujo con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001, se observó que el hongo tiene un comportamiento similar al del presente trabajo, donde el basidiomiceto disminuyó el pH del medio hasta un valor de 5,56.

En este trabajo, el pH final que se obtuvo está dentro del rango que otros trabajos obtuvieron, lo que indica que *P. pulmonarius* PSC 2001 disminuyó su pH a niveles óptimos para el desarrollo de su metabolismo. De acuerdo con Neto et al., (2009) y Hofrichter et al., (1999), esto ocurre porque el hongo produce ácidos orgánicos con el fin de disminuir el pH del medio y así optimizar la producción de enzimas que aceleran la degradación de compuestos aromáticos y estructuras de lignina.

Según la FAO, para abonos orgánicos, sobre todo compost, el pH define la supervivencia de los microorganismos y cada grupo tiene pH óptimos de crecimiento y multiplicación. La mayor actividad bacteriana se produce a pH 6,0- 7,5, mientras que la mayor actividad fúngica se produce a pH 5,5-8,0. El rango ideal y que se recomienda para abonos orgánicos es de 5,8 a 7,2. FAO (2013), por lo que acorde a dicho parámetro, el pH resultante del tratamiento estaría levemente inferior al deseado. Tal característica podría ser corregida realizando un encalado con algún corrector básico de pH, como podría ser cal viva

5.2 Enzimas

5.2.1 Lacasas

Posteriormente evaluó la actividad enzimática de lacasas y manganeso peroxidasas debido al uso de ellas como indicadores de crecimiento de *P. pulmonarius*.

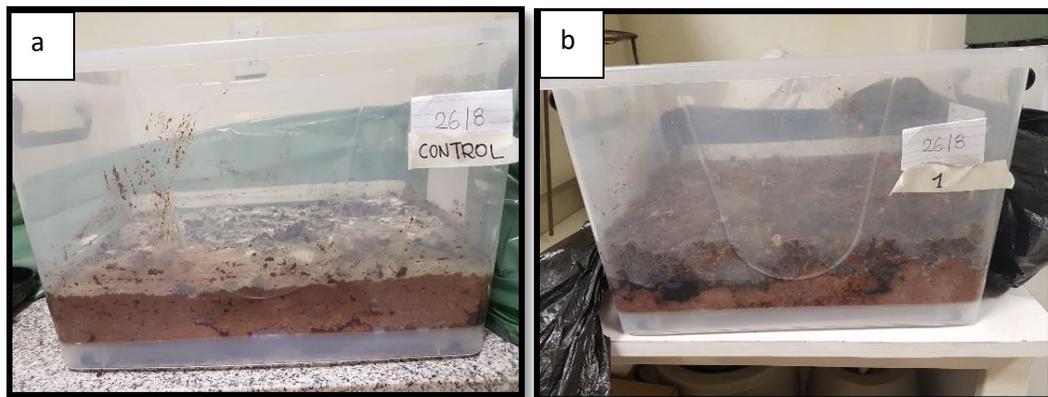


FIGURA 7: 7A CONTROL A LOS 60 DÍAS. 7B TRATAMIENTO 1 A LOS 60 DÍAS.

Se puede observar en la **Figura 7**, que la Caja 1 tiene un desarrollo fúngico similar al del Control. Esto se debe a que *P. pulmonarius* no la colonizó y se pudo corroborar esta situación cuando en el análisis enzimático de ambas cajas los resultados arrojaron cero, eso se debe a que la cantidad

de inóculo agregada no fue suficiente para colonizar el sustrato o la homogeneización no fue la óptima, y como el residuo no se encontraba esterilizado, el hongo basidiomiceto no fue próspero a la hora de competir y colonizar el alperujo.

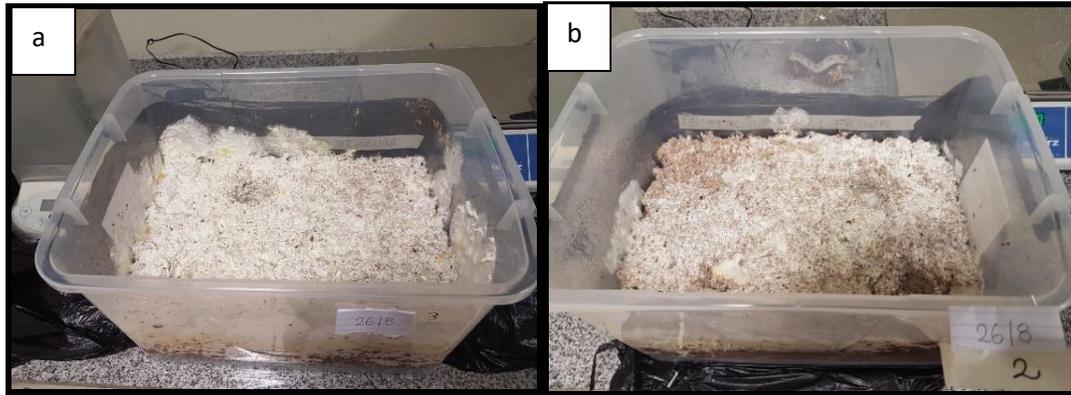


FIGURA 8: TRATAMIENTO 3 (8A) Y TRATAMIENTO 2 (8B) A LOS 60 DIAS DE CULTIVO DEL HONGO P. PULMONARIUS

En contraparte, en la **Figura 8**, se observa la Caja 2 y 3, donde a los 60 días de tratamiento, el residuo se encuentra completamente colonizado por el hongo basidiomiceto *P. pulmonarius* PSC 2001. Y esto además se visibilizo en los análisis de lacasas peroxidadas, donde se obtuvieron valores altos de la enzima. Además, el desarrollo del hongo basidiomiceto no fue similares en la caja 2 y 3. La caja 3 presentó un desarrollo y crecimiento mucho mas rápido que la caja 2, por lo que la actividad enzimática entre ambas cajas fue diferente, haciendo que los datos tengan mucha variabilidad entre ellos.

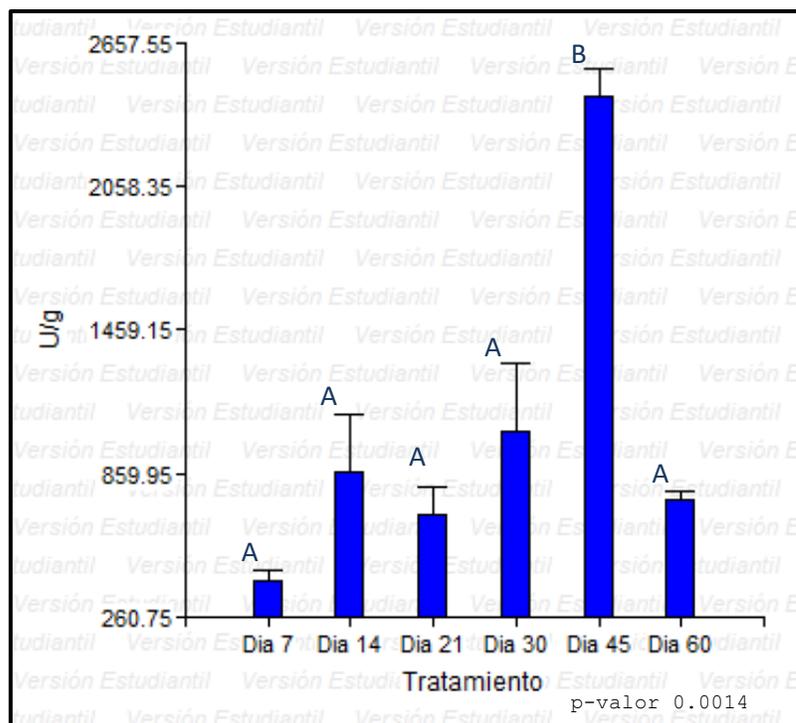


FIGURA 9: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASAS EN U/G OBTENIDAS DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS.

Se observa en la **Figura 9** la actividad de enzima lacasa a lo largo del desarrollo fúngico de 60 días. El análisis estadístico de la varianza arroja que, para un nivel de significancia de 0,05, no presento diferencias significativas entre los días 7, 14, 21, 30 y 60, pero si se presenta diferencia significativa en el día 45. Esto podría explicarse debido a que la cantidad de muestras utilizadas fueron pocas, ya que la caja 1 y la caja control fueron descartadas del análisis por no presentar producción enzimática asociada a *P. pulmonarius* PSC 2001, esto se puede corroborar al observar las **Figuras 7a y 7b** donde no hay desarrollo fúngico. Por lo tanto, la muestra podría no ser representativa.

TABLA 4: VALORES MÁXIMOS OBTENIDOS DE U/G DE ENZIMA LACASAS PARA UN TIEMPO FERMENTATIVO DE 21 DIAS EN DIFERENTES SUSTRATOS.

Sustrato	<i>Trametes versicolor</i> U/g	<i>Pleurotus floridae</i> U/g	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (U/g)
Salvado de trigo	0,94	0,84	-
Tuza de mazorca	1,58	3,2	-
Paja de trigo	3,07	3,21	-
Alperujo	-	-	678,85

Fuente: Garcia Torres y Torres Sae (2003) y valores de la presente tesina.

Según la **Tabla 4**, que ha sido adaptada del trabajo de García Torres y Torres Sáe (2003) en dicho ensayo, se seleccionaron los sustratos de alto contenido lignocelulósico y previamente esterilizados se cultivaron con diferentes especies de hongos basidiomicetos durante 21 días. En el análisis se obtuvieron como valores máximos de enzima lacasas con 3,07 y 3,21 U/g, para el sustrato de tuza de mazorca de los basidiomicetos *Trametes versicolor* y *Pleurotus floridae* respectivamente, y que son valores enzimáticos marcadamente inferiores a los 678,85 U/g de *Pleurotus pulmonarius* utilizando el sustrato de alperujo.

En su trabajo, Souza (2011), realizó un ensayo para eliminar el Pentaclorofenol (PCP) en un cultivo sumergido, y midió las lacasas producidas por el hongo *Pleurotus pulmonarius*, previamente cultivado en un medio con patata dextrosa (PD). Esto se realizó en un período de 5 días en condiciones estacionarias. Los resultados arrojaron, que la concentración de lacasas llegó hasta los 227 U/g aproximadamente.

Teniendo en cuenta que el sustrato utilizado es diferente, según se muestra en la **Tabla 4**, a la empleada en la presente tesina, siendo el alperujo un residuo que presenta en su composición lignina y compuestos fenólicos, (Benítez et al, 2005), pueden haber influido en la producción enzimática por parte del hongo, ya que los resultados obtenidos en la presente tesina son

mayores a los obtenidos por García Torres & Torres Sáe, (2003). Pero son considerablemente altos como los resultados para 5 días en el trabajo de de Souza et al., (2011) que trabajo en la degradación de pentaclorofenol (PCP) también con *P. pulmonarius*.

Se ha demostrado en trabajos posteriores, que los medios complementados con compuestos fenólicos producen un incremento en la actividad enzimática de lacasas de *P. pulmonarius* según Souza et al. (2011). Como lo expresa en su estudio Benítez et al (2005), el residuo alperujo tiene un alto contenido en polifenoles. Por lo tanto, el aumento en la actividad de lacasas por el hongo basidiomiceto *P. pulmonarius* PSC 2001 fue afectada por la presencia de inductores (Stajic et al, 2005), que en este caso se refiere a los compuestos fenólicos, debido a las características del residuo que se emplearon en la presente tesina.

Los resultados obtenidos de la producción de la enzima en alperujo resultan de importancia ya que al que presentar el residuo compuestos que inducen la producción de lacasas, nos indica que el mismo puede ser degradado y que además permite que la degradación del residuo ocurra en períodos más cortos de tiempo.

5.2.2 Manganeso peroxidasas

A continuación, se analiza el comportamiento de la enzima Mn- peroxidasa en la degradación biológica del alperujo con *Pleurotus pulmonarius*.

La medición de la actividad enzimática de MnP sirve como un parámetro indirecto del desarrollo fúngico. La producción enzimática indica que el hongo es capaz de crecer en este tipo de residuo y de su capacidad de degradar al mismo (Koutrotsios y Zervakis, 2014).

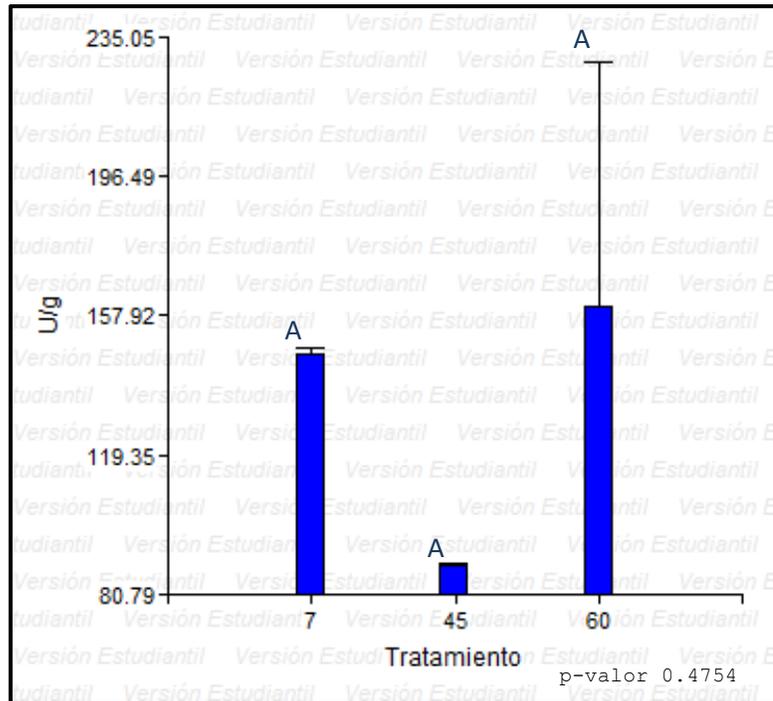


FIGURA 10: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASAS EN U/G OBTENIDAS DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Se contabilizó la producción de la enzima a lo largo de 60 días (**Figura 10**), los datos utilizados fueron la obtención de Mn- peroxidasas de las cajas 2 y 3 debido a que, como se mostró en las **Figuras 8a y 8b**, el hongo se desarrolló en éstas, a diferencia de la caja 1, en la cual no se observó desarrollo de *P. pulmonarius* PSC 2001 (**Figura 7b**). El análisis estadístico de la varianza arroja que, para un nivel de significancia de 0,05, no demostró tener diferencias significativas en la producción de la enzima manganeso peroxidasa, esto puede ser debido a que la cantidad de muestras no fueron suficientes para obtener un resultado representativo.

TABLA 5: VALORES DE ENZIMA MN- PEROXIDASA PRODUCIDOS POR *P. PULMONARIUS* PARA DOS SUSTRATOS DIFERENTES.

Sustrato	Mn- peroxidasa (U/g)	Días de Cultivo
Cultivo sumergido en pentacloro fenol (Souza, 2011).	6	5
Alperujo	166,2	7

Fuente: Souza (2011) y valores de la presente tesina.

Considerando la **Tabla 5**, en la medición realizada en el presente trabajo de la enzima Mn- peroxidasa a los 7 días, se observó que fue de 166.2U/g.

La producción de la enzima Mn- peroxidasa fue estudiada en el trabajo de de Souza et al. (2011), quien realizó un ensayo para eliminar el Pentaclorofenol (PCP) en un cultivo sumergido, y midió esta enzima producida por el hongo *Pleurotus pulmonarius*, previamente cultivado en un medio con patata dextrosa (PD). Esto se realizó en un período de 5 días en condiciones estacionarias. El cultivo sumergido se llevó a cabo con solución mineral, usando glucosa y tartrato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno. Los resultados obtenidos para la concentración de Mn- peroxidasa en un período de 5 días fue de aproximadamente 6 U/g.

La diferencia en la producción de estas enzimas puede deberse a las características que presenta el alperujo en su composición. Se sabe que el manganeso desempeña un papel crucial en la degradación de la lignina por los hongos ligninolíticos mediante la regulación de las enzimas exocelulares como manganeso peroxidasas (Bonnarme y Jeffries, 1990). En su trabajo, Masaphy et al. (1996), mostraron que el agregado de Mn en los cultivos líquidos aumenta la producción de las enzimas MnP por el hongo *P. pulmonarius*, incrementando la biotransformación de la atrazina. En el trabajo de Souza et al., (2011) no hubo un agregado de manganeso al cultivo sumergido. En cambio, el contenido de este nutriente en el alperujo puede ser de 66,7ppm (Ordoñez, et al., 1999).

Teniendo en cuenta que los contenidos de manganeso en alperujo son mayores a los que presenta el cultivo sumergido, esto indicaría que, dado la característica del residuo empleado en el presente trabajo, el Mn estaría estimulando la síntesis de las enzimas manganeso peroxidasas en el hongo basidiomiceto *P. pulmonarius* PSC 2001 por lo que se observan resultados mayores a los obtenidos por de Souza et al. (2011).

Es importante destacar que los estudios citados realizan sus trabajos con medios estériles, si bien resulta importante para la investigación, en la presente tesina, no se trabajó de esta manera con el fin de permitir que esta metodología tenga una aplicación práctica y pueda ser llevada a escala piloto. Esto implica que otros microorganismos estén presentes en los medios pero la mayor actividad de lacasas y manganeso peroxidasas, se encontraron en el efluente tratado con el hongo y no en el control, excluyendo los datos en el presente trabajo ya que los resultados fueron nulos, lo que indica que son propias de los hongos basidiomicetos, en este caso de *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001.

5.3 Fracción orgánica y nutrientes

5.3.1 Materia orgánica

Se realizó el análisis de la variación del porcentaje de materia orgánica (MO) y carbono orgánico (CO).

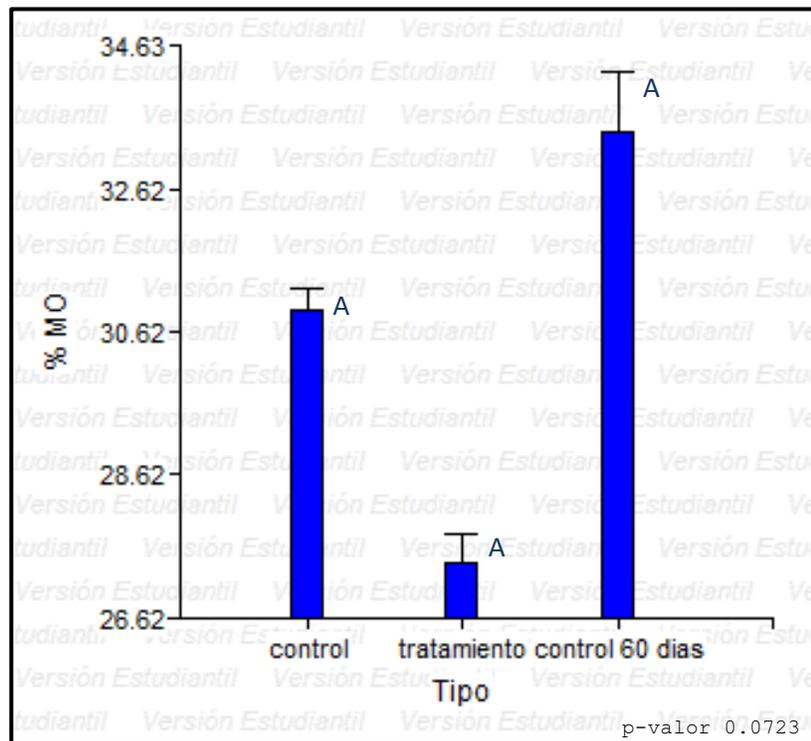


FIGURA 11: VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE MO EN EL RESIDUO LUEGO DE 60 DIAS.

Como se muestra en la **Figura 11**, el porcentaje de materia orgánica del alperujo al día cero es de $30,93 \pm 0,52\%$ y el porcentaje de ésta en el tratamiento a los 60 días, es de $27,38 \pm 0,69\%$ lo que significa que hubo una disminución de aproximadamente 11% en el porcentaje de MO, y el control a los 60 días presentó un aumento hasta los $33,4 \pm 1,49\%$. El análisis estadístico indica que para un nivel de significancia de 0,01 no hay diferencias significativas entre las tres muestras.

5.3.2 Carbono orgánico

También se contabilizó el porcentaje de carbono orgánico (CO) en muestras del residuo al día cero y luego de 60 días de biodegradación con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 y también el control a los 60 días.

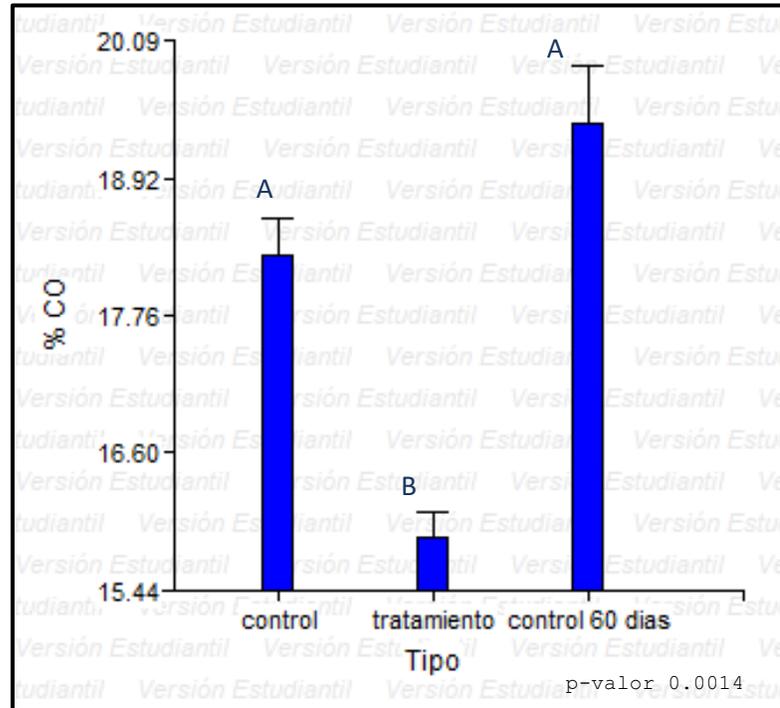


FIGURA 12: VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE CO DEL RESIDUO LUEGO DE 60 DIAS DE TRATAMIENTO.

Según se observa la **Figura 12**, el porcentaje de Carbono Orgánico del residuo es de $18,26 \pm 0,56\%$, el control a los 60 días presentó un aumento hasta los $19,38 \pm 0,86\%$ y luego del tratamiento con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001, se observó una disminución hasta los $15,88 \pm 0,40\%$, según los datos arrojados por el laboratorio de Química Agrícola, lo que indica un decrecimiento del 13% en el CO luego de 60 días del cultivo del hongo basidiomiceto en el alperujo. El análisis estadístico nos indica que para un nivel de significancia de 0,01 el tratamiento tiene diferencias significativas con el control y el control a los 60 días, mientras que éstos dos últimos no presentan diferencias significativas entre ellos.

5.3.3 Nutrientes

A continuación, se presenta el análisis de los nutrientes, siendo que fueron evaluados los porcentajes de Nitrógeno, Fósforo y Potasio como principales sustentos, teniendo en cuenta que el objetivo del presente trabajo es que el residuo obtenido pueda ser empleado como un abono orgánico.

Nitrógeno

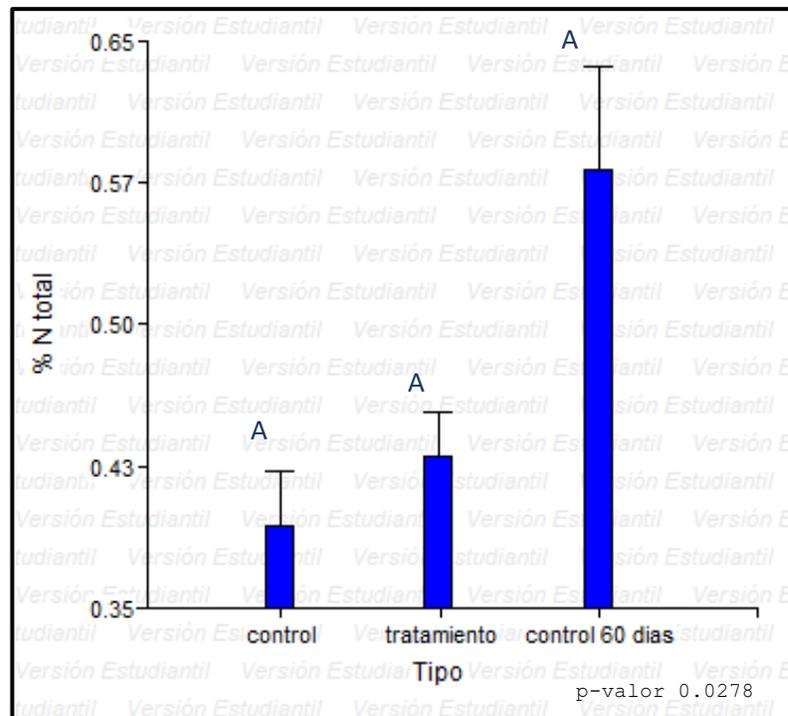


FIGURA 13: VARIACIÓN DEL PORCENTAJE DE NITRÓGENO.

Observando la **Figura 13**, enfocándonos en el porcentaje de Nitrógeno total, se advierte que el contenido inicial es de $0,40 \pm 0,05\%$, el control a los 60 días es $0,58 \pm 0,09\%$ y al finalizar el tratamiento con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 es de $0,43 \pm 0,04\%$. Indicando así un aumento en el 7,5% del porcentaje de nitrógeno en el residuo biodegradado. El análisis estadístico arroja

que para un nivel de significancia de 0,01 las diferencias entre las tres muestras no son significativas.

Fósforo

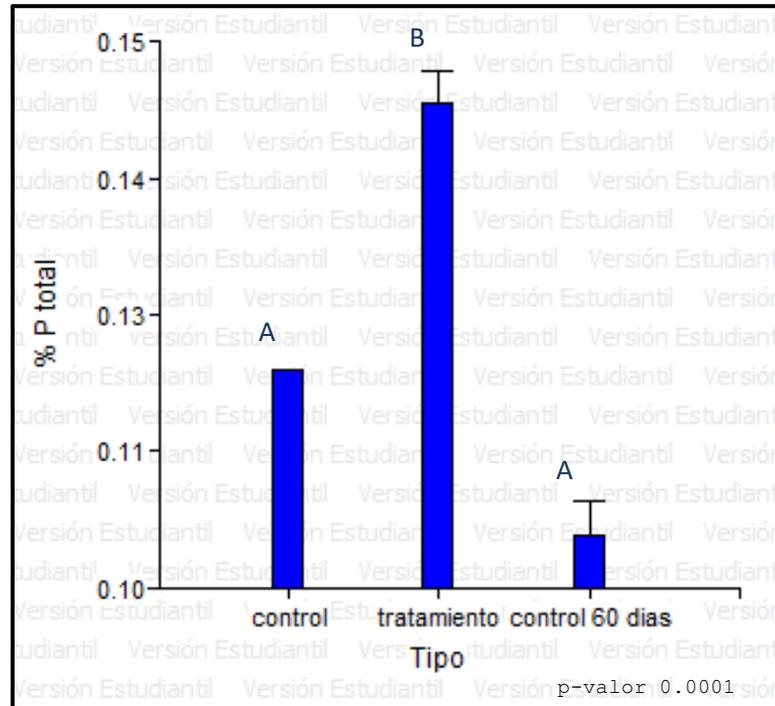


FIGURA 14: VARIACIÓN DEL PORCENTAJE DE FÓSFORO

Volviendo a la **Figura 14** y observando el porcentaje de fósforo, se puede apreciar que hay un aumento, antes del tratamiento, el valor es de un promedio de $0,12 \pm 0,1\%$ y luego de la degradación con el hongo basidiomiceto es de $0,15 \pm 0,1\%$. Lo que indica un incremento del 22% en el contenido de fósforo, el control a los 60 días tuvo una disminución hasta los $0,1 \pm 0,01\%$. El análisis estadístico arroja que para un nivel de significancia de 0,01 hay diferencia significativa entre el tratamiento y ambos controles, pero entre estos dos últimos no son significativamente diferentes.

Potasio

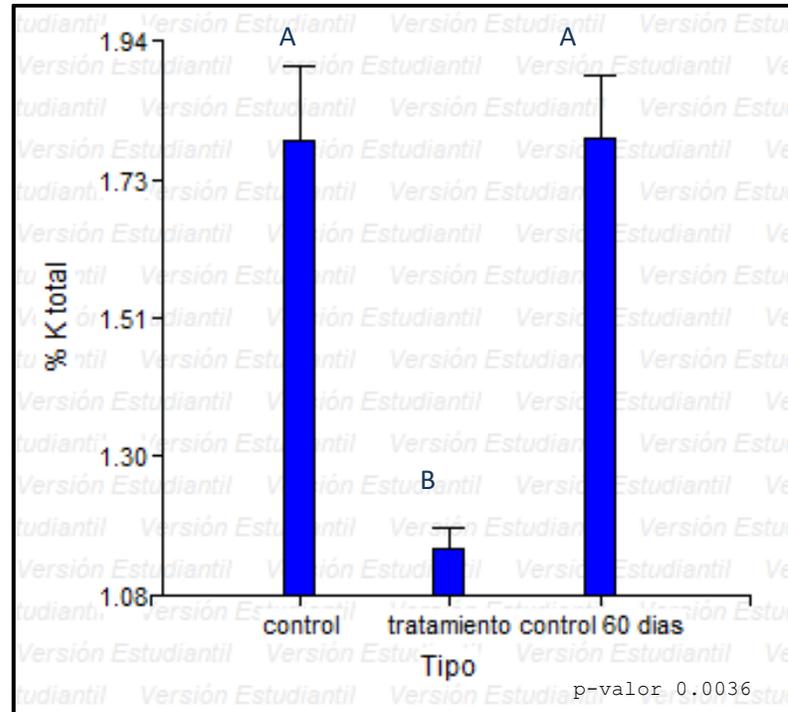


FIGURA 15: VARIACIÓN EN EL PORCENTAJE DE POTASIO

Como se observa en la **Figura 15**, el porcentaje de potasio al iniciar es de $1,79 \pm 0,20\%$ y luego del tratamiento biológico disminuye a $1,16 \pm 0,06\%$, lo que significa una reducción del 35% y el control a los 60 días se mantiene en $1,79 \pm 0,17\%$. El análisis estadístico nos indica que para un nivel de significancia de 0,01 hay diferencias significativas entre el tratamiento y ambos controles, pero éstos dos últimos no son significativamente diferentes.

5.3.4 Relación C: N

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis de la relación C: N realizados.

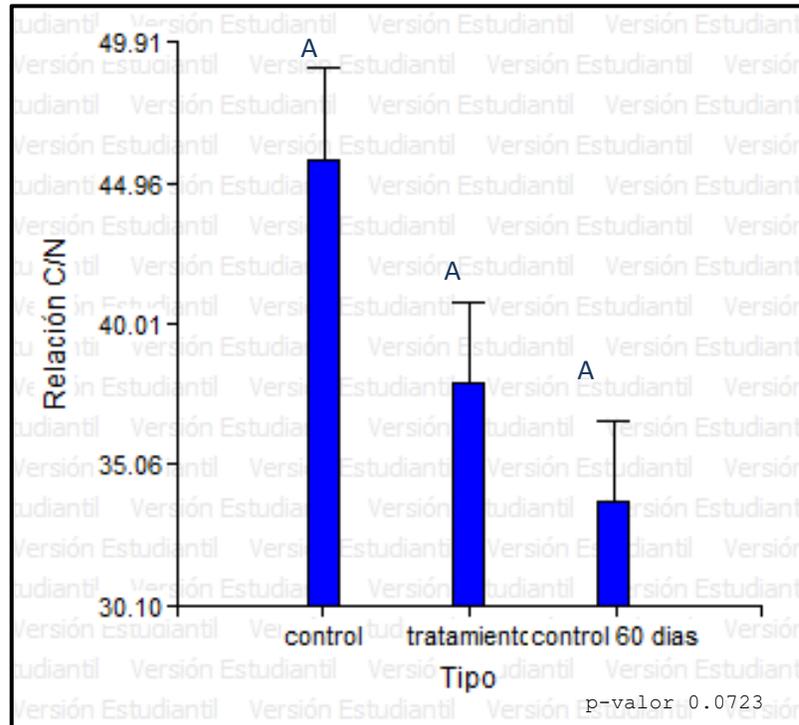


FIGURA 16: RELACIÓN C: N DE RESIDUO AL DÍA CERO Y LUEGO DE SU TRATAMIENTO CON *P. PULMONARIUS* A LOS 60 DIAS.

La **Figura 17** muestra como la relación C:N sufre una disminución del 18% cuando al residuo se lo somete a una biodegradación con el hongo basidiomiceto *P. pulmonarius* PSC 2001 a lo largo de 60 días. El valor de la relación C:N del alperujo inicialmente es de $45,74 \pm 6,67$ y al finalizar el tratamiento se reduce a $37,73 \pm 4,87$ y la muestra control disminuyo hasta los $33,78 \pm 4,81$. El análisis estadístico nos indica que para un nivel de significancia de 0,01 las tres muestras no presentan diferencias significativas.

Conclusiones fracción orgánica y nutrientes.

En el trabajo realizado por Rodríguez et al. (2018) donde se cultivaron dos cepas del hongo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* se utilizó como sustrato al orujo de pera en un período de cultivo de 45 días. En dicho trabajo se analizó el contenido de materia orgánica al comienzo y finalización del ensayo, y los datos obtenidos también fue una disminución de la MO en aproximadamente un 24% en promedio entre ambas cepas.

El autor Rodríguez Núñez (2015), en su trabajo utilizó como sustratos pulpa de café, residuos de plátano y fruto de café y realizó la biodegradación con especies de *Pleurotus spp*, se realizó para un tiempo de cultivo de 30 días. Se contabilizó la MO al principio y final del ensayo y se observó que hubo una disminución de 9, 7 y 7% respectivamente para cada sustrato. Se registró el contenido de CO al principio y final del ensayo y se observó que hubo una disminución de 8, 5 y 3 % para cada sustrato. El porcentaje de nitrógeno orgánico también fue analizado y se observó que hubo un aumento del contenido de este nutriente de 90,2, 65,2 y 25,2%. Por último, los resultados arrojados en el análisis de la relación C:N, fue que hubo una reducción para todos los sustratos. Esto fue 51, 44 y 12% respectivamente.

En su tesis doctoral, González Saavedra (2007), trabajó la biodegradación del alperujo con *P. ostreatus*, en el mencionado trabajo se realizó el cultivo del residuo, previamente esterilizado, y fue incubado durante 4 meses en una cámara oscura controlada. Se observó que el tratamiento con este hongo basidiomiceto disminuyó significativamente el contenido del carbono orgánico total contenido en el alperujo natural. Porcentualmente, esa disminución fue de un 21%. El contenido de Nitrógeno varió al principio y final del ensayo. Se observó que hubo un incremento del 71,6% de este mineral. Siendo el contenido inicial de 8,1% y al término del ensayo aumentó a 13,9%. Se realizó el estudio de la relación C:N, que resultó en la disminución de 64 a 29, lo que indica aproximadamente un 55% de reducción.

Retomando el trabajo de Koutrotsios y Zervakis (2014), donde analizaron el comportamiento de varias especies de hongos basidiomicetos en la biorremediación del residuo proveniente de la industria olivícola, alpechín. El ensayo consistió en el cultivo de distintas especies de hongos

basidiomicetos durante 30 días en condiciones estacionarias de temperatura en 100 mL de alpechín previamente esterilizado. En el análisis del contenido de Fósforo (g kg^{-1}) antes del tratamiento era de 1,01 y luego de la degradación con el hongo basidiomiceto fue de 1,08 indicando un aumento del 7%

En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares en cuanto al comportamiento de las fracciones orgánicas y nutrientes en comparación a los trabajos mencionados, en conclusión, para 30 días de tratamiento la disminución es de hasta 8%, para 60 días un 13% y 4 meses 21%, lo que muestra que luego de la biorremediación se produce un decrecimiento en el contenido de MO donde Rodríguez Núñez (2015) enuncia que, en el proceso de degradación mediado o acelerado por hongos basidiomicetos, se resalta la importancia de una serie de factores que afectan la mineralización de los materiales orgánicos, así como el crecimiento de estos hongos. La rapidez con la que la materia es oxidada dependerá de la calidad del mismo compuesto, de la presencia de los organismos descomponedores idóneos y de las condiciones fisicoquímicas del medio circundante. La calidad del sustrato viene determinada por los atributos tanto físicos como químicos del mismo. Obteniendo como resultado la disminución de la MO. Ésto se debe a que el carbono orgánico del alperujo contiene apreciables cantidades de carbono hidrosoluble. Este carbono contiene la fracción más fácilmente metabolizable de la materia orgánica (Ceccanti et al. 1997; García et al. 1994), y en ella se incluyen varios tipos de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como polifenoles, ácidos alifáticos simples, ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares (Fox & Cormfield, 1990). El consumo de estas fracciones orgánicas durante el desarrollo del hongo en el alperujo reduce significativamente los niveles de carbono hidrosoluble al final del periodo experimental.

La concentración de Nitrógeno y Fósforo total se incrementaron después de la biodegradación del alperujo con *P. pulmonarius* PSC 2001, este incremento podría responder a un efecto de concentración debido a la mineralización de la materia orgánica producida durante la descomposición, donde los hongos liberan altas cantidades de nutrientes (Medina et al., 2009).

Según Chang (1989) las sales de potasio, entre otras, estimulan el crecimiento y fructificación de *Pleurotus spp* generando los basidiocarpos. En el ensayo, en ambas cajas 1 y 2, se vio el

crecimiento de basidiocarpos por parte de *P. pulmonarius*, como se muestra en la **Figura 16a** y **16b**, por lo tanto, es probable que el contenido de potasio haya sido mayor en los basidiocarpos, dejando así al residuo tratado con un contenido menor de este nutriente.

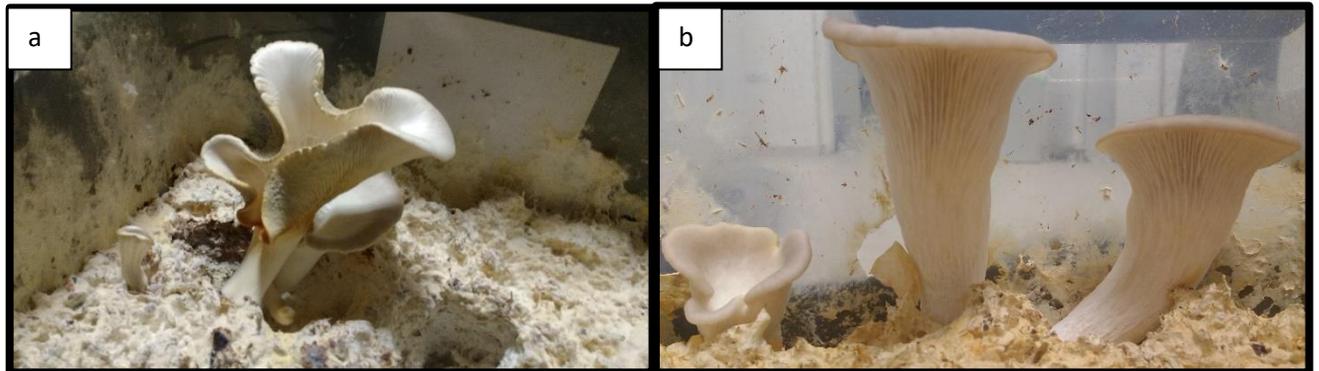


FIGURA 17: BASIDIOCARPOS (CUERPOS DE FRUCTIFICACIÓN) FORMADOS EN CAJA 2 (16A) Y CAJA 3 (16B)

En la presente tesina se vio también una reducción de la relación C:N, que se logra como resultado del aumento de la concentración de nitrógeno total y la reducción del carbono orgánico total. Según Labrador (2001), la relación C:N es el factor más importante en un proceso de degradación y debe controlarse para asegurar una fermentación correcta siendo este uno de los parámetros que mejor indica la descomposición de los materiales orgánicos.

Teniendo en cuenta las recomendaciones de la FAO (2013), que se muestran en la **Tabla 6**, para abonos orgánicos.

TABLA 6: SUGERENCIA DE PARÁMETROS PARA ABONOS.

Parámetro	Sugerencia
MO	mayor al 20%
Nitrógeno	0,3% – 1,5%
Fósforo	0,1% – 1,0%
Potasio	0,3% – 1,0%
Relación C:N	35:1 a 15:1

La mayoría de los porcentajes de fracciones orgánicas y nutrientes del alperujo luego de la biorremediación con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001, se mantienen dentro de los parámetros recomendados por la FAO, ya que la MO es de 27%, K es 1,16%, 0,15% el P y 0,43% N. El parámetro que presenta niveles mas altos que los sugeridos es la relación C:N que es de 37:1 aproximadamente, y para disminuirla se debería agregar un material rico en Nitrógeno.

5.3.5 Análisis ecotoxicológico.

En el siguiente apartado se muestra los resultados obtenidos a partir del ensayo ecotoxicológico realizado en el marco del presente ensayo.

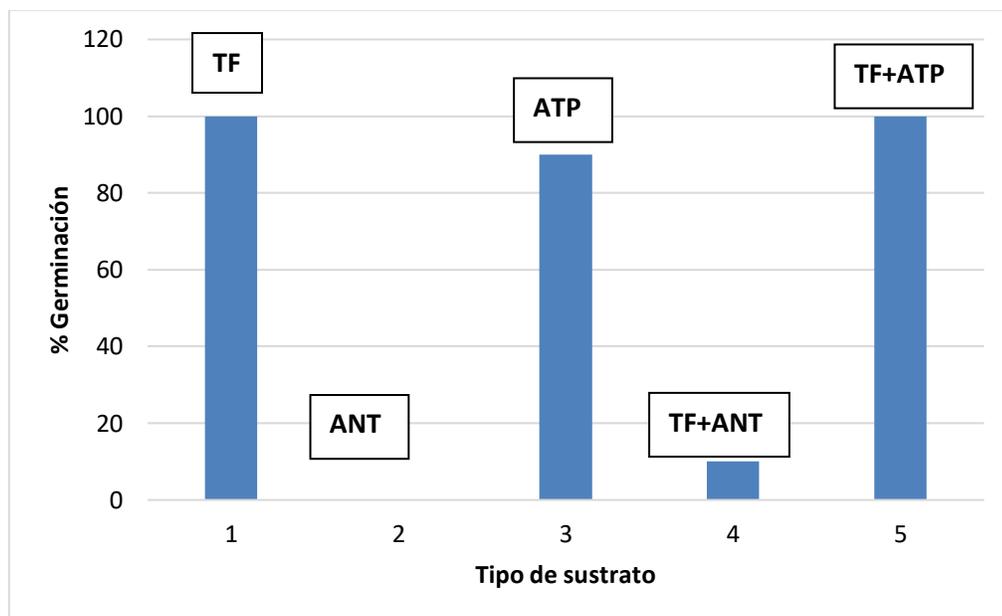


FIGURA 18: PORCENTAJE DE GERMINACIÓN PARA CADA SUSTRATO.

Luego del ensayo de germinación de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), en cada uno de los diferentes sustratos se realizó el cálculo del índice de germinación, estos resultados están representados en la **Figura 18**, donde se muestra que el sustrato TF y TF+ATP obtuvieron un

%G de 100%, el sustrato ATP es 90% el TF+ANT es de 10% y por último el sustrato ANT donde no hubo germinación.

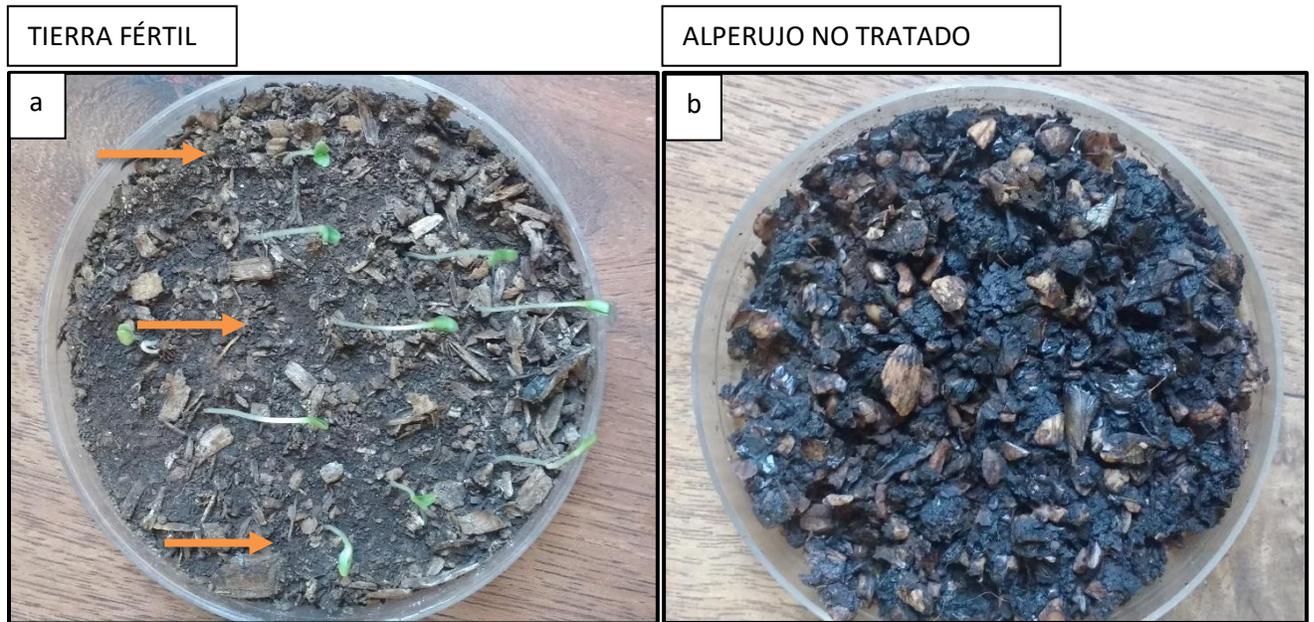


FIGURA 19: 19A SUSTRATO DE TIERRA FÉRTIL CON HOJAS GERMINADAS Y 19B ALPERUJO NO TRATADO SIN GERMINACIÓN DE HOJAS DE SEMILAS DE *LACTUCA SATIVA*.



FIGURA 20: 20A ALPERUJO TRATADO CON HOJAS GERMINADAS Y 20B ALPERUJO MÁS TIERRA FÉRTIL CON HOJA GERMINADA DE *LACTUCA SATIVA*.

ALPERUJO TRATADO MAS TIERRA FÉRTIL



FIGURA 21: ALPERUJO TRATADO MÁS TIERRA FÉRTIL CON HOJAS GERMINADAS DE LACTUCA SATIVA.

Las **Figuras 19, 20 y 21** revelan como las plántulas de *Lactuca sativa* emergieron en los diferentes sustratos, aunque no se pueda visibilizar la totalidad de las hojas debido a la calidad de las imágenes, se demuestra que los sustratos de tierra fértil, alperujo tratado y tierra fértil más alperujo tratado (**Figura 19a, 20a y 21**, respectivamente) fueron los que obtuvieron mayor número de hojas emergidas, a diferencia de alperujo y tierra fértil más alperujo (**Figura 19b y 20b** respectivamente) en las cuales no hay emisión de hojas o el número es muy bajo.

En su tesis doctoral, González Saavedra (2007), trabajó la biodegradación del alperujo con *P. ostreatus*, en el mencionado trabajo se realizó el cultivo del residuo, previamente esterilizado, y fue incubado durante 4 meses en una cámara oscura controlada. Para el examen fitotóxico se realizó con la metodología descrita por Zucconi y col. modificada, mediante la cual se realizó un ensayo de germinación “in vitro” de semillas de *Lepidium sativum* L., comúnmente denominado “berro de agua”. Los resultados arrojados fueron traducidos en un acusado aumento del índice de germinación (41%) de las semillas de berro ensayadas, y por tanto una significativa disminución de su fitotoxicidad.

En el citado trabajo de Koutrotsios & Zervakis (2014), donde analizaron el comportamiento de varias especies de hongos basidiomicetos en la biorremediación del residuo proveniente de la industria olivícola, alpechín. El ensayo consistió en el cultivo de distintas especies de hongos basidiomicetos durante 30 días en condiciones estacionarias de temperatura en 100 mL de alpechín previamente esterilizado. Se utilizó también la metodología descrita por Zucconi y col., para el ensayo ecotoxicológico, utilizando semillas de *Lepidium sativum* L., los resultados que se obtuvieron luego del cultivo de basidiomicetos fue que *Abortiporus biennis* obtuvo el mejor desempeño al demostrar un aumento del 30% del índice de germinación con respecto a la OMW no tratada.

En el presente trabajo se observó también el aumento de porcentaje de germinación para los sustratos ATP y TF+ATP, que son aquellos que poseen al residuo tratado con *P. pulmonarius* PSC 2001. En general, la toxicidad del alperujo se asoció con la presencia de compuestos aromáticos de bajo peso molecular y con la inhibición sinérgica causada por compuestos fenólicos, Koutrotsios y Zervakis (2014). El aumento en el %G, según González Saavedra, (2007), es causado por la reducción en los compuestos fenólicos, juntamente con el aumento de la concentración de la mayoría de los nutrientes en el alperujo biodegradado con el hongo basidiomiceto. Esta eliminación de los compuestos del residuo debido a la inoculación y desarrollo del hongo basidiomiceto es posible por la excreción de la exoenzima lacasa en un medio que contiene sustancias fenólicas. Las lacasas son enzimas extracelulares no específicas que tienen el cobre como cofactor y utilizan oxígeno molecular como un aceptor de electrones y que puede oxidar polifenoles como también otros compuestos (Robles et al. 2000; Davis & Burns, 1990). También fue la enzima manganeso-peroxidasa (MnP), una enzima lignocelulósica que oxida componentes fenólicos de la lignina, mediante la reacción de oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , que es dependiente del H_2O_2 , (Wesenberg et al., 2003).

Vale la aclaración de que el ensayo, a diferencia de los trabajos mencionados, que fueron germinados en extractos de los residuos degradados, se hizo sobre estratos sólidos y utilizando como control a tierra fértil. Debido a esto es que se registraron IG mayores a los observados en los trabajos citados.

6. PROPUESTA DE TRATAMIENTO A ESCALA PILOTO.

En el proceso de producción de aceite de oliva se generan residuos, estos se caracterizan por concentrarse en pocos meses del año, de marzo a julio, por lo que su disposición y manejo se dificultan, generando sitios de acumulación y produciendo contaminación ambiental (Crespo et al., 2013). El alperujo puede causar contaminación en el suelo si es volcado o utilizado como abono (Ruiz et al., 1997). Por lo que resulta necesario que los mismos cuenten con un tratamiento adecuado con el fin de reducir su impacto ambiental (Duarte et al., 2012). Como se ha manifestado en la presente tesina, el tratamiento de residuos de la industria olivícola con el hongo *P. pulmonarius*, consiste en una metodología simple y de fácil aplicación por lo que podría utilizarse a una mayor escala. Algo importante a destacar es que el procedimiento no cuenta con etapas complejas, como por ejemplo esterilización del residuo, condiciones estacionarias de temperatura durante el tratamiento, correcciones de pH etc., por lo cual podría ser fácilmente transferida a otra escala. Con los resultados obtenidos en la presente investigación se pretende proponer un tratamiento a escala piloto teórico con el fin de poder desarrollarse la misma como una alternativa en el tratamiento del alperujo. La propuesta consiste en realizar el tratamiento mediante una pileta en la cual se va a disponer el residuo generado junto con el medio de cultivo sólido del hongo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001, para esto es necesario tener en cuenta la cantidad de residuo que se va a tratar y la cantidad del cultivo sólido del hongo requerida para realizar el tratamiento. Tomando como modelo los datos de producción de la Fábrica Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) y sabiendo que por cada 1000kg de aceitunas procesadas se generan 850kg de alperujo (Roig et al., 2006; Morillo et al., 2009), podemos estimar la cantidad de residuo producido. La Fábrica Experimental en la temporada 2017 procesó en total aproximadamente, 117811kg de aceitunas (Chumbita, 2017) por lo que el alperujo total producido estimado fue de 100139kg. En promedio por día se procesaron 3553,8kg de aceitunas en la campaña 2017, lo que indica que se generaron aproximadamente 3021kg de alperujo por día. Por lo que se propone realizar el tratamiento piloto teórico de la producción promedio de alperujo por día, teniendo en cuenta de que el objetivo final del tratamiento es disminuir la fitotoxicidad del residuo.

Acorde a los resultados de la presente tesina, se debe determinar la cantidad de cultivo sólido de hongo necesaria. Aunque hubo problemas en una de las cajas, hacer la proporción 2:1 fue exitoso en las otras dos, y lo que es importante a destacar es que la mezcla del inóculo del basidiomiceto y el residuo debe ser lo más homogénea posible.

Como en el presente trabajo, en una caja de 50L se realizó la biorremediación de 7,5 kg de residuo más inóculo de hongo, teniendo ésta la altura necesaria para no producir anoxia se calculó a partir de esta relación las dimensiones de la pileta para el tratamiento. De acuerdo con la cantidad de residuo a tratar y a la cantidad de cultivo sólido de hongo necesaria, se propone que la pileta tenga una dimensión de 6 m de largo por 3 m de ancho con una altura de 0,50 m y un desnivel de 10 cm, presentando un volumen total de aproximadamente 10000L. La profundidad de esta es baja, ya que es necesario que no se generen zonas anaeróbicas que puedan producir malos olores y el surgimiento de organismos que desfavorezcan el crecimiento de *P. pulmonarius*.

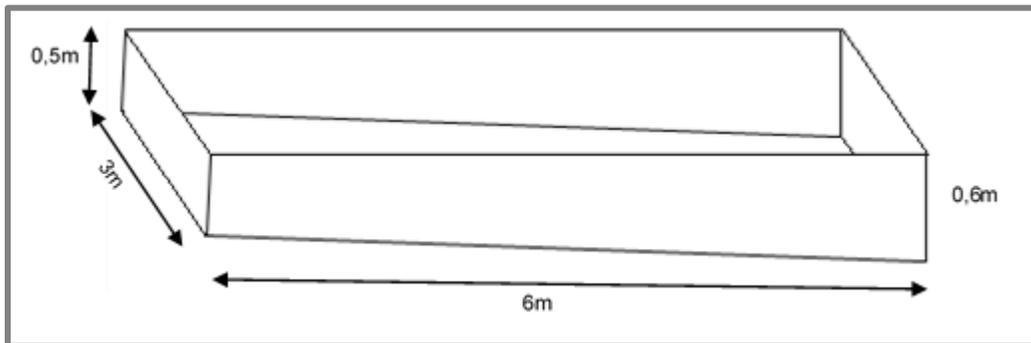


FIGURA 22: PILETA DE TRATAMIENTO A ESCALA PILOTO DE ALPERUJO CON *P. PULMONARIUS* PSC 2001

6.1 Manejo de la pileta

El manejo del tratamiento de la pileta, como se observa en la **Figura 22**, debe ser manual. Se vuelca el residuo en la pileta y a medida que se realice esto, se debe homogeneizar con el cultivo del hongo basidiomiceto. Para lograrlo, se pueden utilizar herramientas, como, por ejemplo, palas.

En la **Figura 22** se observa que la pileta tiene un desnivel, su propósito es que, si el residuo tiene un excedente de agua, ésta se concentrará en la parte más baja para evitar estancamiento y anoxia, el líquido puede recogerse y regar el cultivo del hongo en la pileta pero evitando la concentración de éste, pero en contraparte, si no se encuentran altos niveles de humedad, se recomienda controlarlo, regando el residuo inoculado con el basidiomiceto al menos dos veces a la semana.

En el transcurso de 7 días, se recomienda hacer una nueva inoculación si se observa que el crecimiento del hongo no es el óptimo y, además, para evitar el crecimiento de otras especies que compitan con *P. pulmonarius* y no se produzca un crecimiento eficaz. Se sugiere que el tratamiento no se prolongue más de 30 días.

Como resultado final, no solo se obtiene un residuo tratado, sino que también, se puede reutilizar como inóculo del hongo basidiomiceto para incorporarlo en un nuevo tratamiento de biorremediación en pileta de residuo. Si se utiliza como abono orgánico, el hongo *Pleurotus pulmonarius* es una especie inocua y no conllevaría a tener un impacto negativo en el suelo, y si tuviera alguna generación de basidiocarpos, éstas son setas comestibles que podrían ser de utilidad.

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo fue realizado para desarrollar un método de tratamiento biológico sobre el residuo de la industria olivícola, alperujo, a través de la biodegradación con el hongo basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 para disminuir su fitotoxicidad y pueda ser utilizado como abono natural.

Los resultados que se obtuvieron nos permiten concluir que el cultivo del basidiomiceto es capaz de crecer y utilizar dicho residuo como sustrato, siendo verificado en los resultados analizados en la producción de lacasas y manganeso peroxidasas, que son utilizadas como parámetros indirectos de desarrollo fúngico. La producción de ambas enzimas en el presente trabajo fue ampliamente superior que el obtenido en los estudios de otros autores. Esto se debe a la composición del alperujo, que lo transforman en un sustrato con características que estimulan la producción de enzimas de *P. pulmonarius* PSC 2001.

En cuanto a los parámetros físico-químicos y orgánicos, se determinó que el hongo disminuye la materia orgánica un 11%, el carbono orgánico un 13%, la relación C:N el 18% y el contenido de potasio un 35% respecto del control.. Se mostro un aumento en el nitrógeno de 7,5% y también del fósforo un 22%. Respecto al análisis toxicológico, se observó que el porcentaje de germinación aumentó hasta un 80% luego del tratamiento biológico.

Se debe destacar que los valores obtenidos en los resultados se mantienen dentro de los parámetros que la FAO recomienda para abonos orgánicos. Los únicos parámetros por corregir son el pH, que es menor al recomendado, por lo que es necesario hacer una corrección con cal activada, y también la relación C: N, que, al ser alta, se lo debe disminuir con el agregado de un material rico en nitrógeno. Además, también es importante que a la hora de mezclar el inóculo del hongo y el alperujo se logre una buena homogenización, para evitar problemas de concentración de residuo y el basidiomiceto no tenga las condiciones óptimas para crecer.

8. RECOMENDACIONES

Si el alperujo tratado con *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 será utilizado como abono orgánico, se debe hacer la corrección necesaria a la relación C:N y pH.

Otra alternativa, teniendo en cuenta que los hongos del género *Pleurotus* son hongos comestibles producidos a nivel mundial, y de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesina, donde el hongo *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001 logro formar basidiocarpos, se recomienda realizar futuros ensayos con el fin de utilizar el alperujo como sustrato para el cultivo del hongo, siendo necesario conocer el proceso de producción del cultivo del basidiomiceto, determinar su viabilidad económica y los análisis pertinentes para el consumo humano.

Por último, otro uso que se ha dado al alperujo es para alimento de ganado. Luego del tratamiento con el basidiomiceto, se podría llevar a cabo un estudio con los análisis adecuados donde se permita esclarecer si es factible alimentar animales con el alperujo biodegradado con *P. pulmonarius* PSC 2001.

Todas estas recomendaciones permiten darle diversas alternativas al residuo, logrando el reciclaje y disminuyendo el impacto que generaba en el ambiente.

9. BIBLIOGRAFIA

- Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biores. Technol.* 91: 195-200.
- Aranda E; I Sampedro; J. A Ocampo Y García-Romera. 2006. Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth. Granada, España. 4-6
- Barreto, C., Rozas, M., López-Piñero, A., Numnes, J.M., García, A. 2000. Efectos de la aplicación de residuos de almanzara en el fósforo asimilable y otras propiedades edáficas de un olivar en regadío. *Edafología* 7: 29-38.
- Benítez, E.; Sainz, H.; Nogales, R. (2005). Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Biores.Technol.* 96: 785– 790.
- Bhatti, M.I. y otros autores, Growth, development and yield of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.Ex. Fr) Kummer as affected by different spawn rates, *Pak. J. Bot.* 39(7), 2685-2692 (2007).
- Blika, P.S. y otros tres autores, Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global Nest Journal.* Vol. 11 (3): 364-372. (2009).
- Borja R; F Raposo Y B Rincón. 2006. Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. *Grasas y aceites* 57, 32-46.
- Cabrera, F., Madejón E., Romero S.A., López R. 2002. Diagnóstico y estudio de alpechines, orujos y alpeorujos. Jornadas de investigación y transferencia tecnología al sector oleícola. Córdoba. pp. 195-199.
- Cáceres R.; R Novello Y M Robert. 2009. Análisis de la cadena del olivo en Argentina. INTA, Argentina. P 13-25

- Caputo, A.C., Scacchia, F., Pelagagge, P.M. 2003. Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Appl. Therm. Eng.* 23: 197- 214
- Cardoso, S.M., Coimbra, M.A., Lopes da Silva, J.A. 2003. Calcium-mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydr. Polym.* 52: 125-133.
- Chumbita, N. 2017. Caracterización y propuesta de tratamiento para efluentes líquidos generados en la elaboración de aceite de oliva en la Planta Piloto de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. 76 p.
- Crespo D; P Monetta; E Bustos; L Orden Y P Rizzo. 2013. Tratamiento de residuos olivícolas. INTA, Argentina. P 12-16
- Dávila G Y R Vázquez-Duhalt. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje bioquímico*, Vol. XXX, 29-55.
- de Souza, D. F., da Costa, S. C., Dacome, A. S., de Souza, C. G. M., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2011). Pentachlorophenol removal by *Pleurotus pulmonarius* in submerged cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 357–362.
- Duarte K. R; A. C Freitas; R Pereira; J. C Pinheiro; F Goncalves; H Azaari; M. E Azzouzi; A Zrineh; S Zaydoun; A. C Duarte Y T. A. P Rocha-Santos. 2012. Treatment of Olive Oil Mill Wastewater by Silica–Alginate–Fungi Biocomposites. Portugal. P 13
- Duarte J. C; S. O Pires; S. M Paixao; M. C Sàágua. 2011. New approaches to olive mill wastes bioremediation. Lisboa, Portugal. P 25
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jiménez, A. 2002a. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alperujo" *J. Agric. Food Chem.* 50: 6804-6811.
- Filippin, A.E y otros cuatro autores, Evolución de la lignina y celulosa durante el compostaje de mezclas de alpeorujo. *Argentina y Ambiente* 374-379. (2012). P 4

- Frattini Florencia (2019). TRATAMIENTO BIOLÓGICO DEL EFLUENTE DE LA INDUSTRIA OLIVÍCOLA MEDIANTE EL USO DEL HONGO BASIDIOMICETO *Pleurotus pulmonarius* PSC 2001. Universidad nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina p 16-19
- García Torres, A. M., & Torres Sáe, R. G. (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. V, 56–64.
- Georgios I. Z; K Georgios Y K Panagiotis. 2013. Composted versus Raw Olive Mill Waste as Substrates for the Production of Medicinal Mushrooms: An Assessment of Selected Cultivation and Quality Parameters. Grecia. P 2-6
- Gloria, M., Arias, O., García, B., Betancourt, I., & Álvarez, A. (2005). Biotransformacion de Residuos Lignocelulosicos. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 36.
<https://revista.cnice.edu.ar/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2005-4-CB-084.pdf>
- González Saavedra, M. (2007). Biodegradación del alperujo utilizando hongos del género *pleurotus* y anélidos de la especie *Eisenia foetida*. 227.
- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W., & Hatakka, A. (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1864–1870.
<https://doi.org/10.1128/aem.65.5.1864-1870.1999>
- Instituto De Desarrollo Rural. 2010. Olivo. Censo frutícola provincial Mendoza-Argentina. 2
- Internacional Olive Council. 2018. Cifras del mercado mundial de aceite de oliva.2
- Koutrotsios, G., & Zervakis, G. I. (2014). Comparative examination of the olive mill wastewater biodegradation process by various wood-rot macrofungi. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/482937>

- Kuo, M. 2017. *Pleurotus pulmonarius*. Retrieved from the mushroomExpert.Com Web site: http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_pulmonarius.html
- Kuwahara M; J. K Glenn; M. A Morgan Y M. H Gold. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 169: 247-250.
- Lechner, Bernardo E. 2002. Estudio de la biodiversidad, fisiología y cultivo de las especies silvestres del género *Pleurotus* (Basidiomycetes, Agaricales) en la República Argentina. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina. 191 p
- Martín, A.I., Moumen, A., Yañez, D.R., Molina, E. 2003. Chemical composition and nutrients availability for gotas an sheep of teo-stage olive cake and olive leaves. Animal Feed Sci. Technol. 107: 61-74.
- Martín-García, I., Yañez-Ruiz, D., Moumen, A., Molina-Alcaide, E. 2004. Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal supply on two-stage olive cake fermentation. Animal Res. 53: 245-257.
- Masghouni, M., Hassairi, M. 2000. Energy applications of olive-oil industry byproducts: I. The exhaust foot cake. Biomass Bioenerg. 18: 257-262.
- Mata G; D Salmones Y J. M Savoie. 2017. Las enzimas lignocelulíticas de *Pleurotus* spp. En Sánchez J.E Y D. J Royse. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. Ed. Ecosur. Chiapas, México. p. 63-82.
- Medina C, Paredes C, Pérez–Murcia M, Bustamante M, Moral R. Spent mushroom substrate as component of growing media for germination and growth of horticultural plants. Rev Bioresource Technol. 2009;100:4227-4232.
- Mendez Y., Canitrot L., Informes de cadenas de valor Olivícola. (2018) Secretaria de Política Económica. Argentina. P 4-6

- Molina, E., Nefzaoui, A. 1996. Recycling of olive oil by-products: possibilities of utilization in animal nutrition. *Int. Biodet. Biodegr.* 38: 227-235.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., and Russell, N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 25-39.
- Neto, S. L. M., Matheus, D. R., & Machado, K. M. G. (2009). Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5), 1075–1082. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500003>
- Norma EPA/600/40-90/027F
- Ordoñez, R., González, P., Giráldez, J.V., García-Ortiz, A. 1999. Efecto de la enmienda con alpeorajo sobre los principales nutrientes de un suelo agrícola. *Estudios de la zona no saturada*. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón. ICIA. pp. 123-126. ISBN: 84-66-99-1258-5.
- Periasamy K, Natarajan K. 2004 – Role of lignocellulosic enzymes during basidiomata production by *Pleurotus djamor* var. *roseus*. *Indian Journal of Biotechnology* 3, 577–583.
- Rios, M., Hoyos Concha, J., Mosquera Sánchez, S., Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggelis, G. G., Daniel J. Royse y José E. Sánchez, Fountoulakis, M. S., Dokianakis, S. N., Kornaros, M. E., Aggelis, G. G., Lyberatos, G., Motato R., K., Mejía G., A., León P., A., Higman, & Burgt. (2002). Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. *Bioresource Technology*, 3(2), 4735–4744. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00043-3)
- Rodríguez, G. E., Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., & Agüero, M. S. (2018). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kummer on pear pomace: Evaluation of

- productivity and chemical composition of the biodegraded substrate. *Anales de Biología*, 40, 21–30. <https://doi.org/10.6018/analesbio.40.03>
- Rodríguez Núñez, J. R. (2015). Acción degradativa de hongos Basidiomycetes sobre residuos agroindustriales de cultivos de café y plátano. 126.
- Roig, A., Cayuela, M.L., and Sanchez-Monedero, M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag* 26, 960-969.
- Román P., Martínez M M., Pantoja A., FAO. Manual de compostaje del agricultor. (2013). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Santiago de Chile. 14-18
- Ruiz, J.L., Dobao, M.M., Tejada, M., Benítez, M.C., González, J.L. 1997. Evolución de las propiedades químicas de un suelo tras la adición de distintos tipos de orujo de aceitunas. II Congreso Iberoamericano de Ciencias Hortícolas. Vilamoura, Portugal. pp. 475-481.
- Salmones D Y G Mata. (2005). Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus spp.* *Revista mexicana de micología* 21, 63-69.
- Sampedro I; S Marinari; A D' Annibale; S Grego; J. A Ocampo Y I Garcia-Romera. 2007. Organic matter revolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. Viterbo, Italia. 3-7
- Sampedro, M.I. 2005. Disminución de la fitotoxicidad de alpeorujo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Tesis doctoral, Universidad de Granada, España. 3-8
- Sánchez J.E Y D. J Royse. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus spp.* Ed. Ecosur. Chiapas, México. 4-8
- Siracusa, G., La Rosa, A.D., Siracusa, V., Trovato, M. 2001. Eco-compatible use of olive husk as filler in thermoplastic composites. *J. Polym. Environ.* 9: 157-161.

- Tortosa, G. y otros tres autores, The production of comercial organic amendmets and fertilisers by composting of two phase olive mil waste (“alperujo”). *Journal of Cleaner Production* 26: 48 – 55 (2012).
- Varnero, M.T., K. Galleguillos y R. Rojas, Sistemas de compostaje para el tratamiento de alperujo. *Información Tecnológica*: 22(5), 49-56 (2011).
- Wahab N. A; N Abdullah Y N Aminudin. 2014. Characterisation of Potential Antidiabetic-Related Proteins from *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Grey Oyster Mushroom) by MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 131607.
- Wajid Khan, Muhammad Asif Ali, Nasir Ahmad Khan², Muhammad Aslam Khan, Abdul Rehman & Nazir Javed. 2013. Effect of different levels of lime an pH on mycelial growth and production efficiency of oyster mushroom (*Pleurotus spp.*). *Pakistan*- 3-5
- Wolfenden, R. S. y Wilson, R. L. 1982. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reaction: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 02*: 805-812.
- Yesilada O; S Sik Y M Sam. 1997. Treatment of Olive Oil Mill Wastewater With Fungi. *Turquía*. 5-7
- Yesilada O; S Sik Y M Sam. 1998. Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *Turquía*. 5-9
- Zuconi F., Pera A., Forte M., and de Bertoldi M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* 22,2: 54-57.