

Tópicos sobre diversidad,
ecología y usos de los

HONGOS

en Iberoamérica





INSTITUTO DE
ECOLOGÍA, A.C.



CONACYT



D.R. © Instituto de Ecología, A.C.
Km. 2.5 Carretera antigua a Coatepec No. 351
Congregación El Haya, Xalapa 91070, Veracruz, México

ISBN 970-709-104-5

Título: Tópicos sobre diversidad, ecología y uso de los hongos microscópicos en Iberoamérica.

Editora: Gabriela Heredia Abarca

Impreso en México. Proagraf S.A. de C.V. Salvador González No. 10-B. Col. José Cardel.
Xalapa, Ver. México.

Diseño y coordinación editorial: Juan Arturo Piña Martínez

Capturistas: Rosa María Arias Mota y Cinthya I. Becerra Hernández

Corrección de textos: Rosa María Arias Mota

Forma sugerida para citar este libro: Heredia, G. (Editora). 2008. Tópicos sobre diversidad, ecología y uso de los hongos microscópicos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. México, 386 pp.

D.R. © La reproducción y/o difusión de esta publicación para efectos educativos y otros propósitos no comerciales no requiere autorización siempre y cuando se citen los derechos de autor de la Red REDEMIC. La reproducción de este material, ya sea completo o en parte con propósitos comerciales está prohibida sin la autorización escrita por el CYTED (Secretaría General, C/Amaniel No. 4, Madrid, España).

CAPITULO 15



TRANSFORMACIÓN DE LOS RESIDUOS PROCEDENTES DEL OLIVO MEDIANTE CEPAS FÚNGICAS

Elizabet Aranda, Inmaculada Sampedro, Rosario Díaz, Mercedes García,
Juan Antonio Ocampo e *Inmaculada García-Romera

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. España
inmaculada.garcia@eez.csic.es



Olivares en Granada, España



RESUMEN

El alpeorujo, residuo procedente de la extracción del aceite de oliva mediante el sistema de dos fases, administrado a dosis equivalentes a la recomendada como abono orgánico es fitotóxico tanto para la germinación de semillas como para el crecimiento de plantas. En la búsqueda de nuevas alternativas de reutilización de este residuo que impliquen el sector agrario y medioambiental se ha puesto de manifiesto que los hongos saprobios disminuyen y algunos eliminan la fitotoxicidad del alpeorujo, debido principalmente a la degradación y/o polimerización de los compuestos fenólicos del alpeorujo, sin embargo también hay otros mecanismos implicados en la detoxificación de dicho residuo como son la producción de enzimas hidrolíticos y ligninolíticos.

ABSTRACT

Olive mill dry residue (DOR), a solid remaining from a two phase manufacturing process, has a phytotoxic effect both in seed germination and the growth of plants. It is very important to look for new alternatives for the reutilization of this residue in the agricultural and environmental sector. Saprobe fungi were able to decrease and eliminate the DOR. Phenolic compounds seem to be the main cause of the phytotoxic effect of DOR and saprobe fungi can decrease phytotoxicity by the degradation and/or polimerization of phenols. However hydrolytic and ligninolytic enzymes can also be important in the degradation of phytotoxic substances present in DOR.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del olivar y la obtención industrial de aceite de oliva tienen una extraordinaria importancia económica y social en España y particularmente, en Andalucía. En la actualidad se están produciendo cambios importantes en las tecnologías de extracción del aceite de oliva. El proceso tradicional o de “tres fases” que da lugar al aceite, residuo líquido (alpechines o aguas de vegetación con un gran poder contaminante) y residuo sólido (orujo) que se está sustituyendo de manera acelerada por el de “dos fases” que da lugar a aceite y a un residuo que incluye el agua de vegetación y restos de pulpa, piel y hueso. Este residuo es, posteriormente desecado y sometido a una nueva extracción industrial para la obtención de aceite de orujo quedando un nuevo residuo o “alpeorujo seco y extractado” (Figura 1). Actualmente más del 70% del aceite de oliva español se extrae con el sistema de dos fases. Este proceso representa un ahorro del consumo de agua y evita la producción de alpechines por lo que puede considerarse como un proceso con mayores ventajas ambientales que el de “tres fases”. Ambas actividades generan enormes cantidades de subproductos con un gran potencial contaminante. El reciclado de esos subproductos representa una vía para disminuir la contaminación ambiental y una posibilidad, tanto de aumentar la eficacia de las producciones agrícola e industrial como de disminuir sus costes de producción.

El aprovechamiento de los subproductos y residuos orgánicos previamente estabilizados



FIGURA 1. A) Olivar. B) Balsas de desecación del alpechin. C) Apeorujo húmedo. D) Alpeorujo seco y extractado. E) Aceite de oliva.

contribuiría a solucionar uno de los mayores problemas que tiene planteado el sector agrario de nuestro país como es la necesidad de aplicar materia orgánica a los suelos. Esa escasez ha provocado una reducción importante de la fertilidad de los suelos, una pérdida de su capacidad productiva y funcional y ha favorecido su degradación y abandono. Debido al elevado coste y la poca disponibilidad de abonos orgánicos, la utilización de residuos orgánicos provenientes de desechos urbanos y vegetales como los residuos generados de la extracción del aceite de oliva, puede ser una vía para la obtención de abonos orgánicos.

Pese a los avances obtenidos en los últimos años, todavía existen dudas sobre la biodegradabilidad de estos efluentes, además, la dificultad técnica y los costes relativamente elevados de tratamiento que no siempre son sostenibles por el sector agrícola dificultan los procesos de biodegradación planteados hasta ahora.

Por otro lado, el previsible aumento de la generación de alpeorujo exige la búsqueda de soluciones que permitan su valorización. Una de las vías que de momento tiene una aplicabilidad más viable es su uso en agricultura para lo cual este subproducto debe ser previamente estabilizado y biotransformado con objeto de obtener enmiendas orgánicas estables, que eviten los efectos nocivos sobre el suelo y los cultivos vegetales que estos puedan generar. Se ha establecido la posibilidad de comportar diferentes residuos y subproductos del sector olivarero como método para la preparación de fertilizantes y enmiendas (Paredes *et al.*, 2002).

Fitotoxicidad del alpeoruj o seco y extractado. El alpeoruj o tiene marcadas propiedades fitotóxicas tanto en la germinación de semillas como en el crecimiento de las plantas ya que se ha observado que la aplicación de 25 g/kg de este produjo una disminución del peso seco de distintas plantas (Figura 2). Uno de los principales responsables de los efectos tóxicos originados en las plantas por los residuos son los compuestos fenólicos que comienzan a mostrar fitotoxicidad a concentraciones de 50 mg/kg (Wang *et al.*, 1967; Fiestas Ros de Ursinos, 1986; Wang *et al.*, 2002b). Es posible que el contenido fenólico del alpeoruj o (26 mg/g) pueda ser el responsable de su fitotoxicidad, por lo que la aplicación de 25 g/kg de alpeoruj o (contenido fenólico 650 mg/kg) daría lugar a la disminución del crecimiento de la planta.

En estudios realizados con alpechín, se ha demostrado que existe un paralelismo entre la toxicidad y la concentración de fenoles siendo la fracción aromática de bajo peso molecular particularmente tóxica (Della Greca *et al.*, 2001; Fiorentino *et al.*, 2003). Ensayos de fitotoxicidad llevados a cabo en plantas de tomate y calabacín, han mostrado que 4-metilcatecol a una concentración de 125 mg/kg causa serios daños en las hojas (Capasso *et al.*, 1992).

Por otro lado, se ha encontrado que el ácido caféico presente en alpechín es uno de los componentes más fitotóxicos para plantas de espárrago y lechuga provocando una reducción de crecimiento de estas a una concentración menor de 99 mg/kg (Chou y Patrick, 1976; Hartung *et al.*, 1990). Además de los factores que afectan a la germinación de las semillas, el efecto fitotóxico del alpeoruj o podría deberse a que la mayoría de sus componentes quedan retenidos en el suelo modificando sus características químicas, físicas y biológicas de forma que perjudican el desarrollo de las plantas.

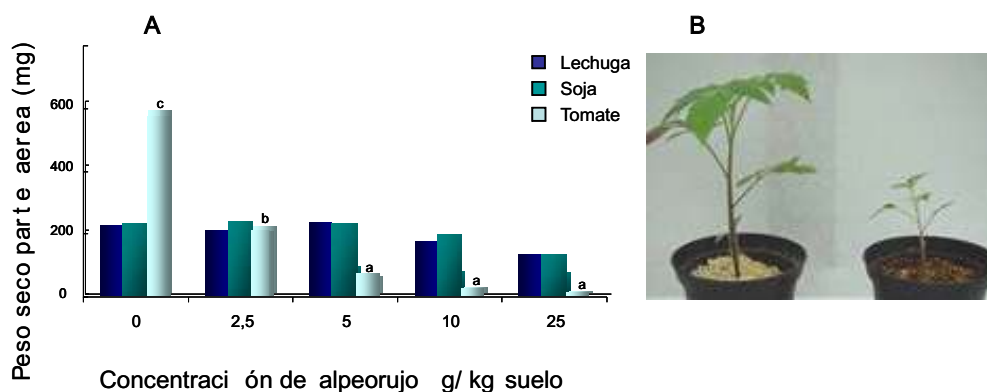


FIGURA 2. A) Peso seco de la parte aérea de plantas de lechuga, soja y tomate crecidas en presencia de distintas concentraciones de alpeoruj o. **B)** Efecto fitotóxico del alpeoruj o en plantas de tomate.

Reducción de la fototoxicidad del alpeorujo mediante el empleo de hongos saprobios.

Los microorganismos son capaces de disminuir la contaminación del suelo originada por los residuos tóxicos generados por las plantas (Arfmann y Rainer, 1990; Moreno *et al.*, 1990). Los hongos lignívoros o de pudrición que en la mayoría de los casos pertenecen a los Basidiomycetes, degradan preferentemente uno o más componentes de la madera causando tres tipos de pudrición: pudrición blanda, pudrición parda y pudrición blanca. Estos últimos tienen capacidad de degradar tanto lignina como compuestos xenobióticos y además detoxificar los residuos del olivar. Por otro lado los hongos saprobios del suelo que se encuentran en la rizosfera y el rizoplaneo de las plantas, a partir de la cual obtienen beneficios nutricionales, tienen capacidad de degradar ácidos orgánicos, disacáridos, pectina, celulosa y lignina. Estos hongos al igual que los que causan la pudrición blanca también tienen la capacidad de mineralizar lignina, descomponer polímeros vegetales y detoxificar compuestos fenólicos.

Uno de los principales mecanismos de detoxificación de los microorganismos se ha atribuido a su capacidad de metabolizar compuestos fenólicos (Hamman *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002a). Se han aislado varias especies pertenecientes al género *Fusarium* de suelos y efluentes industriales caracterizados por tener fenoles o hidrocarburos que han demostrado ser muy

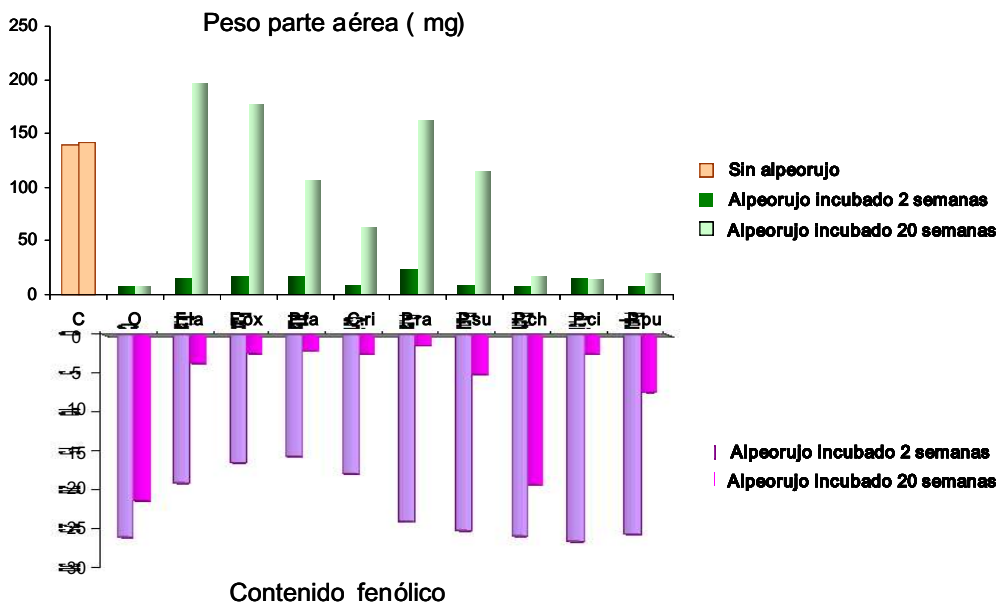


FIGURA 3. Peso de la parte aérea de plantas de tomate cultivadas en presencia del alpeorujo incubado y sin inocular a diferentes tiempos con los hongos saprobios. *Fusarium lateritium* (F.la), *F. oxysporum* (F.ox), *Paecilomyces farinosus* (P.fa), *Corioliopsis rigida* (C.ri), *Phlebia radiata* (P.ra), *Poria subvermispota* (P.su), *Phanerochaete chrysosporium* (P.ch), *Pycnoporus cinnabarinus* (P.ci) y *Pleurotus pulmonarius* (P.pu).

eficaces en su detoxificación (Anselmo y Novais, 1992; Atagana, 2004; Mendonça *et al.*, 2004; Santos y Linardi, 2004). Algunos hongos saprobios del género *Fusarium*, son capaces de disminuir el contenido fenólico del alpeorujó y se encontró correlación entre dicho descenso y la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujó (Figura 3) (Sampedro *et al.*, 2004). Recientemente se ha establecido que hay relación entre descenso del contenido fenólico por actividad microbiana y disminución de fitotoxicidad (Blum *et al.*, 2000; Caspersen *et al.*, 2000).

Los hongos saprobios de la madera también son capaces de degradar los fenoles presentes en alpechín, en efecto se ha encontrado hongos capaces de reducir el contenido total de fenoles en un porcentaje aproximado entre 65 y 90% en ausencia de suplementos externos adicionados (Martirani *et al.*, 1996; Kissi *et al.*, 2001; Fountoulakis *et al.*, 2002; D'Annibale *et al.*, 2004b). Se ha demostrado que algunos hongos degradadores de la madera disminuyeron la fitotoxicidad y el contenido fenólico del alpeorujó, sin embargo también se ha observado que otros hongos saprobios de la madera que son capaces de disminuir el contenido fenólico del alpeorujó no son capaces de disminuir la fitotoxicidad del alpeorujó. Esta actuación distinta de los hongos saprobios se debe posiblemente a las diferencias en la maquinaria enzimática de cada hongo implicada en la degradación de compuestos fenólicos (Camarero *et al.*, 1994; Giovannozzi-Sermanni *et al.*, 1994).

Además, la toxicidad del alpeorujó incubado con los distintos hongos saprobios, no disminuye de la misma manera ya que se ha observado que la inoculación del alpeorujó con determinados hongos saprobios disminuye el efecto inhibitor de dicho residuo en unas plantas y no en otras. Se sabe que algunos compuestos fenólicos tienen efectos variables en la viabilidad de diferentes plantas (Wang *et al.*, 1967). Por lo tanto, existe la posibilidad de que estos hongos saprobios degraden ciertos fenoles que sean tóxicos para unas plantas y no lo sean para otras. Por otra parte, en determinadas circunstancias cuando un compuesto fenólico presente en residuos complejos se metaboliza por una vía alternativa se pueden generar algunos compuestos intermedios tóxicos (Ramos y Timmis, 1987). Además, el efecto de sustancias fenólicas sobre el crecimiento de plantas podría ser distinto según el suelo donde se desarrolla la planta, de hecho, el contenido en materia orgánica y el pH de los suelos son factores importantes que influyen en la fitotoxicidad de los fenoles (Wang *et al.*, 1967).

Se ha descrito que algunos hongos saprobios son capaces, no solo de reducir, sino de eliminar completamente la toxicidad del alpeorujó. *F. oxysporum*, *F. lateritium* y *P. radiata* transforman totalmente el alpeorujó después de 20 semanas de incubación eliminando totalmente su fitotoxicidad. El alpeorujó es tóxico para las plantas principalmente debido a su contenido fenólico y los hongos saprobios son capaces de disminuir este contenido y con ello la fitotoxicidad del alpeorujó.

Cambios en la composición química del alpeorujo durante el proceso de incubación con hongos saprobios. La acción de los hongos saprobios sobre los compuestos fenólicos del alpeorujo y su relación con la fitotoxicidad es muy compleja, por lo que es importante conocer los mecanismos de acción de los hongos sobre los compuestos fenólicos del alpeorujo. Se ha descrito que los polifenoles existentes en el alpeorujo, aguas residuales de la obtención de la aceituna y alpechín, son de naturaleza muy tóxica y a su vez diversa (Moreno *et al.*, 1990). Los principales fenoles monoméricos de extractos de acetato de etilo del alpeorujo fueron hidroxitirosol, tirosol y catecol. En numerosos estudios se ha confirmado la eficacia de la extracción con acetato de etilo para detectar compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Visioli *et al.*, 1999). No se encontró hidroxitirosol glucósido que previamente había sido identificado en aceitunas maduras y en alpechín (Romero *et al.*, 2002), así como en la extracción del alpeorujo que realizamos con metanol, por lo que suponemos que el método de extracción del residuo influye en el aislamiento de los distintos compuestos fenólicos.

Además se detectaron otros cuatro compuestos fenólicos 4-metilcatecol, ácido vainillico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico y dos compuestos no fenólicos, los ácidos 3,4-dimetoxicinámico y 4-metoxicinámico. Otros ácidos fenólicos, como ácido protocatéquico, ácido veratrílico, siringico, cinámico o p-hidroxyfenilacético, encontrados en el alpechín mediante extracción con acetato de etilo por Balice y Cera (1984) y Lafont *et al.* (1999), no se detectaron en el alpeorujo debido posiblemente a que la extracción con hexano y las diferentes etapas de secado durante el procesado del alpeorujo podría dar lugar a una reducción de ciertos polifenoles respecto al material de origen de la aceituna (Perrin, 1992).

La incubación del alpeorujo con hongos saprobios durante 2 semanas produce sólo la disminución de algunos compuestos monocíclicos mientras que al aumentar las semanas de incubación hasta 20 semanas se eliminaron todos los compuestos (Figura 4). Resultados similares se obtuvieron en estudios con alpechín en los que la incubación con *L. edodes* supuso la eliminación de catecol y derivados del ácido cinámico (D'Annibale *et al.*, 2004a).

Debe considerarse que la habilidad de degradación de los hongos saprobios depende de la concentración de oxígeno y por lo tanto de la porosidad de la matriz, parámetro importante que en la mayoría de los casos va a condicionar la capacidad degradadora de los hongos. Se ha encontrado un descenso del 70% de los polifenoles totales en la pulpa de aceituna tratada durante 10 semanas con *P. flavido-alba* (Linares *et al.*, 2003), mientras que se observó una tendencia similar en alpechín tratado durante 2 semanas con *P. ostreatus* (Aggelis *et al.*, 2003). Se han encontrado diferencias significativas en disminución de fenoles y decolorización de residuos del olivar según los hongos utilizados y el tiempo de incubación (Kissi *et al.*, 2001). Se ha observado que tras 2 semanas de incubación *P. cinnabarinus* y *F. lateritium* eliminaron

prácticamente hidroxitirosol y su glucósido del alpeorujó, sin embargo tirosol se comportó como el compuesto más recalcitrante. Estos resultados se asemejan a los descritos previamente para alpechín donde los o-difenoles como hidroxitirosol se degradaron más

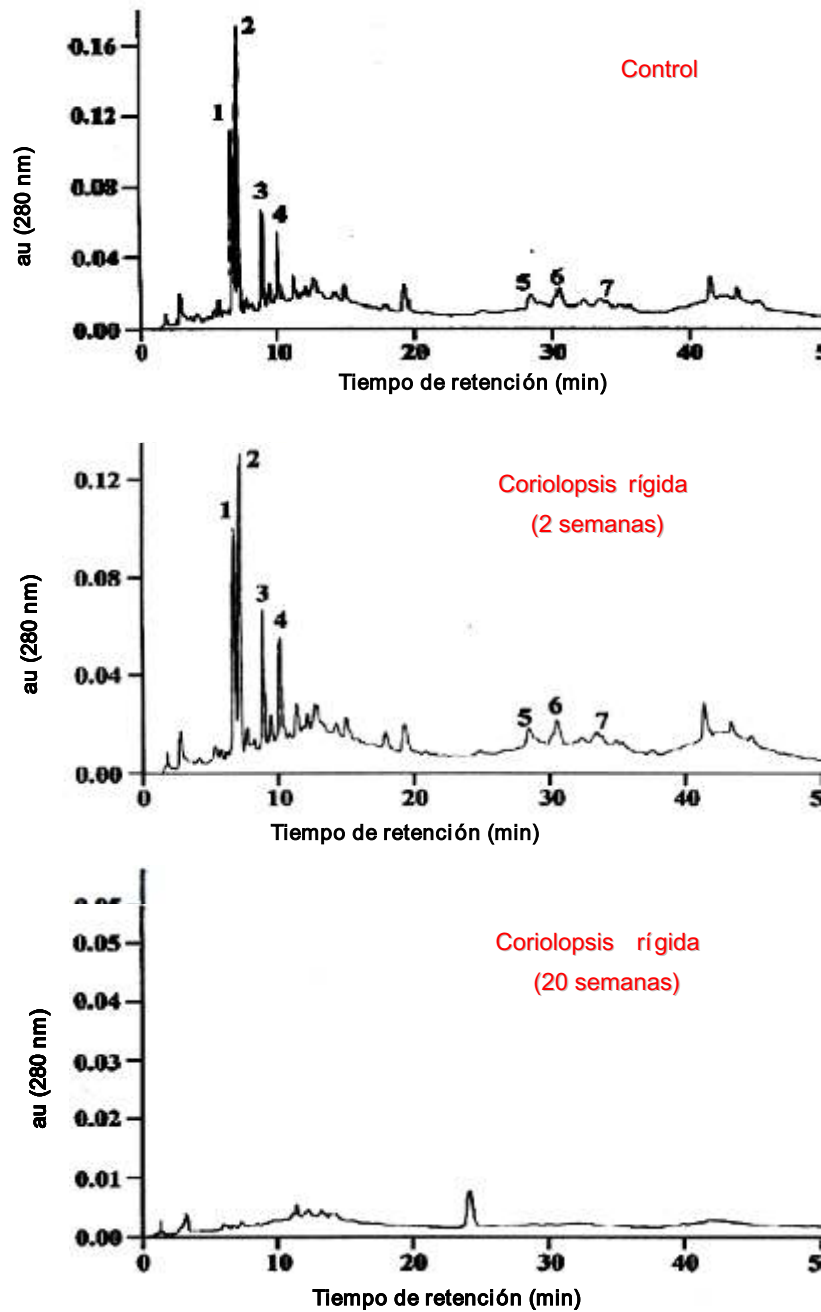


FIGURA 4. Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos presentes en alpeorujó incubado y sin incubar durante 2 y 20 semanas con el hongo saprobios *C. rigida*. Picos: (1) hidroxitirosol 4-glucósido, (2) hidroxitirosol, (3) salidrósido, (4) tirosol, (5) luteolina 7-glucósido, (6) rutina y (7) oleuropeína.

rápidamente que monofenoles, tendencia que se ha confirmado por la mayoría de los hongos ensayados con alpeorujos (Chen *et al.*, 1996; D'Annibale *et al.*, 1998).

Por otra lado, *L. edodes* necesitó 10 días para disminuir a la mitad el contenido de tirosol del alpechín (D'Annibale *et al.*, 2004a) y *Azotobacter vinelandii* tras 7 días de incubación fue capaz de eliminar completamente dicho compuesto en el mismo residuo (Piperidou *et al.*, 2000). De todos los hongos saprobios estudiados, solo *P. chrysosporium* fue capaz de eliminar el tirosol del alpeorujos tras su incubación durante 2 semanas. También se ha demostrado que este hongo es el más efectivo en la eliminación de fenoles tales como los ácidos siríngico, vainílico, p-hidroxi-benzoico y p-cumárico de residuos de maíz (Chen *et al.*, 1996). Se supone que enzimas liberadas por los hongos saprobios durante la incubación de los residuos del olivar primero oxidan y posteriormente polimerizan los fenoles monoméricos, pero la información en el que se describa la transformación de tirosol durante el tratamiento con hongos es muy escasa (Vinciguerra *et al.*, 1997).

Hidroxitirosol es un compuesto que contribuye al potencial biológico del aceite de oliva y alpechín debido a su potente actividad antioxidante (Ryan y Robarts, 1998; Visioli *et al.*, 1995; Galli y Visioli, 1999; Manna *et al.*, 1999). Este compuesto puede obtenerse a partir de aceite de oliva (Chikamatsu *et al.*, 1996), de pasta de aceitunas (Felizón *et al.*, 2000) y de huesos de aceituna y alpechín (Fernández-Bolaños *et al.*, 1998, 2002) mediante tratamiento al vapor. Además se han desarrollado otros métodos de producción de hidroxitirosol como métodos cromatográficos de purificación de alpechín (Capasso *et al.*, 1994) y procedimientos sintéticos (Verhe *et al.*, 1992). Se ha observado que el hongo *P. farinosus* tiene un comportamiento singular en la incubación del alpeorujos ya que hidroliza los fenoles glucósidos en sus respectivos fenoles simples debido posiblemente a la producción por el hongo del enzima - glucosidasa capaz de romper el enlace glucosídico de dichos fenoles. Este resultado tan interesante nos abre la posibilidad de uso del alpeorujos como sustrato para la obtención de antioxidantes fenólicos, concretamente el hidroxitirosol con un consumo energético muy bajo.

El impacto del crecimiento del hongo saprobio sobre la fracción aromática del alpeorujos se hizo evidente después de 20 semanas de incubación. El porcentaje de reducción de fenoles extractables en acetato de etilo obtenido en alpeorujos incubado con hongos del género *Fusarium* parece deberse a la polimerización en lugar de a reacciones de eliminación de fenoles. De hecho, análisis mediante RP-HPLC y GC-MS no mostraron productos típicos de la rotura de anillos fenólicos como serían los ácidos mucónicos o carboximucónicos y sus lactosas derivadas. Además, no se detectaron actividades intracelulares implicadas en la hidroxilación y rotura de anillos fenólicos independientemente del tiempo de incubación. Aunque es importante destacar que algunos estudios han mostrado la capacidad de varias

especies de *Fusarium* de crecer en presencia de fenoles como única fuente de carbono y en las que se detecta enzimas como la catecol-1,2-dioxigenasa o protocatecol-3,4-dioxigenasa sugiriendo la presencia de rutas de rotura de anillos del tipo ortho (Boominathan y Mahadevan, 1989; Santos y Linardi, 2004).

El incremento en el contenido de lignina polimérica precipitable en ácido (APPL) del alpeorujó incubado con hongos del género *Fusarium* durante su incubación podría atribuirse tanto a una fragmentación parcial de la lignina como a la formación de oligómeros a través de acoplamiento oxidativo de componentes aromáticos simples (Figura 5) (Crawford y Pometto, 1988; Giovannozzi-Sermanni *et al.*, 1991). Hay que tener en cuenta que APPL, al ser un polímero intermediario en la degradación de la pared celular de plantas es un carbohidrato más complejo que la lignina (Crawford y Pometto, 1988; Giovannozzi-Sermanni *et al.*, 1991) por lo que el incremento de APPL puede deberse a la acción de enzimas hidrolíticas y ligninolíticas producidas por los hongos saprobios. El incremento en APPL obtenido con alpeorujó ha sido

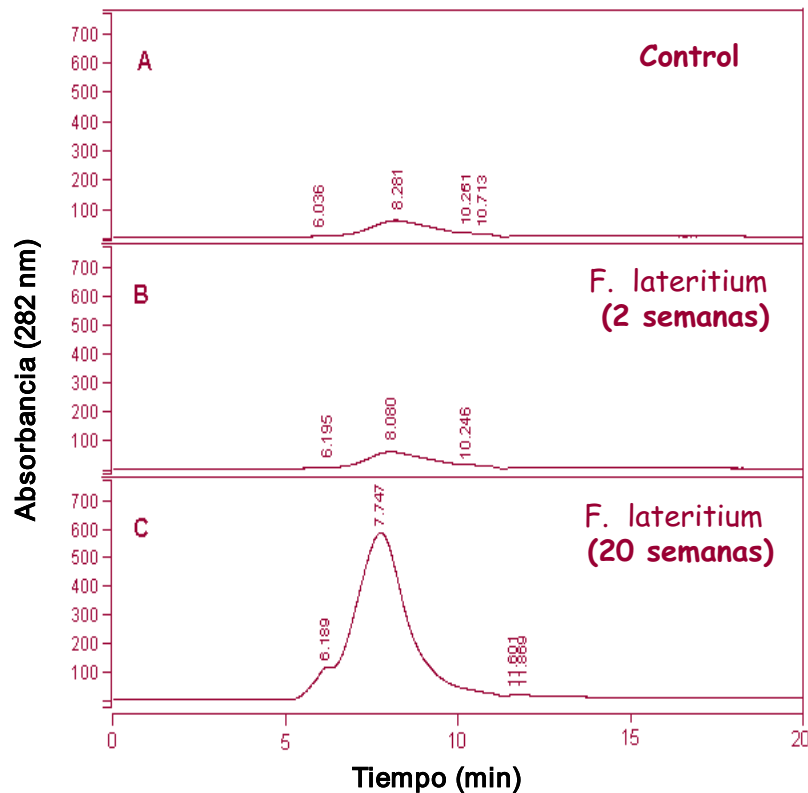


FIGURA 5. Cromatograma SEC–HPLC de lignina polimérica precipitable en ácido (APPL) extractada del alpeorujó no incubado (A) y alpeorujó incubado durante 2 (B) y 20 (C) semanas con el hongo saprobio *F. lateritium*.

también observado en otros estudios llevados a cabo con distintos hongos y diferentes residuos. Se ha observado que el tipo de fuente de nutrientes presente en el residuo influye en la producción de APPL, así se ha demostrado que fuentes orgánicas de nitrógeno aumentaron la degradación de lignocelulosa y la producción de APPL en mayor cantidad que para fuentes de nitrógeno inorgánicas (Iyo y Antai, 1988).

La transformación parcial de fenoles monocíclicos en productos poliméricos en alpeorujos incubados durante su incubación puede ser la causa de la reducción de la fitotoxicidad observada en determinadas plantas. Así, se ha sugerido que el aumento del grado de polimerización de los productos de reacción de las fenoloxidasas con respecto a los compuestos originales pudo dar lugar en un enorme descenso de la accesibilidad a la membrana celular de la planta (Casa *et al.*, 2003).

En general observamos que todos los fenoles monoméricos del alpeorujos seco y extractado se eliminaron tras largos periodos de incubación con los hongos saprobios utilizados. El comportamiento diferente de los hongos después de corto periodo de incubación es un dato importante para optimizar el biotratamiento del alpeorujos.

Mecanismos de eliminación de la fitotoxicidad del alpeorujos por los hongos saprobios

Se han encontrado indicaciones que apuntan a que la reducción de la fitotoxicidad del alpeorujos puede estar relacionada con la disminución del contenido fenólico llevada a cabo por determinados hongos saprobios (Sampedro *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha puesto de manifiesto que determinados hongos saprobios pueden utilizar la producción de enzimas hidrolíticas como mecanismo de detoxificación del alpeorujos (Aranda *et al.*, 2004).

Los fragmentos de paredes celulares y sus componentes como son oligosacáridos y glucoproteínas de residuos vegetales, son tóxicos para las plantas (Bucheli *et al.*, 1990). Los hongos saprobios producen enzimas que degradan polisacáridos de pared celular tanto de tipo constitutivos como inducidos (Mullen y Bateman, 1975). Se ha observado actividad endoglucanasa y endoxilanasas en residuos vegetales incubados con hongos saprobios (Panagiotou *et al.*, 2003). Los hongos saprobios crecidos en alpeorujos producen enzimas hidrolíticas para descomponer la materia orgánica y paredes celulares del residuo y utilizar las fuentes de carbono procedentes de la descomposición para su nutrición.

También se detectó actividad endopolimetilgalacturonasa (endo-PMG), endoglucanasa (endo-GN) y endoxiloglucanasa (endo-XG) en alpeorujos incubados con hongos saprobios y los niveles de las distintas actividades enzimáticas variaron dependiendo del tipo de hongo y del tiempo de incubación de estos en alpeorujos. La actividad endo-PMG producida por la mayoría de los

hongos disminuyó rápidamente después una corta incubación. Este hecho indica la accesibilidad de sustratos pectínicos existentes en alpeorujos y la facilidad de su degradación por la mayoría de los hongos utilizados. No ocurre lo mismo con las actividades endo-GN y endo-XG que se incrementan a lo largo del tiempo de incubación del alpeorujos con la mayor parte de los hongos.

Las moléculas de celulosa y xiloglucano son componentes mayoritarios de las paredes celulares existentes en alpeorujos formando estructuras complejas. Varios hongos son capaces de producir endo-PMG, endo-GN y endo-XG cuando crecen en presencia de extracto acuoso de alpeorujos y que existe una correlación entre el descenso de fitotoxicidad del extracto acuoso de alpeorujos y la cantidad de enzimas hidrolíticos producidos por los hongos saprobios (Aranda *et al.*, 2004). Sin embargo esta correlación no se puede generalizar en alpeorujos. La mayor cantidad de sustratos enzimáticos que se degradan por los hongos y sobre todo la mayor dificultad para acceder a ellos puede explicar que la degradación de los compuestos fitotóxicos de las paredes celulares vegetales existentes en alpeorujos no pueda llevarse a cabo con la misma facilidad que en extractos acuosos de alpeorujos.

La implicación de las enzimas ligninolíticas en la degradación de compuestos recalcitrantes es un tema controvertido. Algunos autores sugieren que no están involucradas en el proceso de detoxificación (Yadav y Reddy, 1992; Bezael *et al.*, 1996; Ichinose *et al.*, 1999) mientras que otros postulan una posible implicación de lacasas y peroxidasas en los procesos de biotransformación durante la degradación de contaminantes aromáticos (Okeke *et al.*, 1994; Gramss *et al.*, 1999).

Solo se detectaron actividades fenoloxidasas en alpeorujos incubado con algunos hongos saprobios, además los valores fueron muy bajos y en la mayoría de los casos disminuían conforme aumentaba el tiempo de incubación. Se sabe que la producción de enzimas ligninolíticas en diferentes especies de hongos depende de la composición y de las condiciones de cultivo (Rogalski *et al.*, 1991; Schoemaker *et al.*, 1991; Hammer y Schauer, 1997), pero sobre todo a la gran heterogeneidad de las especies (Hammer y Schauer, 1997).

La disminución de actividades ligninolíticas con el tiempo de incubación podría explicarse por una inactivación de las enzimas de hecho algunos autores encontraron que *F. solani* inhibía la producción de enzimas ligninolíticas en períodos largos de tiempo (Szklarz *et al.*, 1989). La ausencia total de actividad enzimática en el sobrenadante de cultivos no indica la carencia de capacidad de producir estos, el sistema enzimático puede inhibirse por diferentes factores que interfieren en su expresión (Bollag y Leonowicz, 1984; Deshpande *et al.*, 1992). La baja o nula actividad enzimática detectada podría explicarse si se asume que las moléculas enzimáticas

activos están incorporadas en nuevos productos formados, probablemente de naturaleza soluble polimérica con la consiguiente inmovilización. Así, otros resultados obtenidos con enzimas de diferente naturaleza, como invertasas, fosfatasa y ureasa parecen apoyar esta hipótesis, la adsorción así como la incorporación de estas enzimas en complejos órgano y órgano-minerales redujeron fuertemente la actividad de las enzimas implicadas (Gianfreda *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2000).

Muchos estudios han confirmado los efectos de activación de la producción de enzimas ligninolíticas en residuos vegetales tanto líquidos (Ardón *et al.*, 1996; Crestini *et al.*, 1996) como sólidos (Elisashvili *et al.*, 1998) que contienen fenoles. El alpechín es un extracto de plantas que contiene fenoles y su aplicación a cultivos líquidos de hongos conduce a un incremento de la producción de oxidasas modificadoras de la lignina en *L. edodes*, *P. ostreatus* y *P. chrysosporium* (Vinciguerra *et al.*, 1995; Martirani *et al.*, 1996; Kissi *et al.*, 2001). Este incremento de actividad enzimática en presencia de alpechín puede deberse a un posible mecanismo de defensa que conduce a la activación de oxidasas capaces de polimerizar fenoles simples dando así los productos de reacción incapaces de penetrar en las células o por una respuesta fisiológica del hongo para superar los efectos tóxicos de algunos compuestos de los efluentes o como fenómeno supuesto de inducción (Tomati *et al.*, 1991; Thurston, 1994; Tsioulpas *et al.*, 2002). De hecho, se ha observado en estudios con hongos basidiomicetes que determinados compuestos aromáticos simples provocan la inducción de lacasa (Eggert *et al.*, 1996; Rogalski *et al.*, 1991; Pointing, 2001). Estos efectos estimulatorios de la actividad lacasa por los compuestos aromáticos relacionados con la lignina han sido también descritos para deuteromicetes como *F. proliferatum* y *P. chrysogenum* (Rodríguez *et al.*, 1996; Regalado *et al.*, 1999; Saparrat *et al.*, 2000)

Sin embargo en alpeorujo, a pesar de la presencia de fenoles, se han encontrado niveles muy bajos o nulos de dichas actividades enzimáticas por lo que a pesar de que es necesaria la presencia de fenoles para que se produzca activación de la actividad lacasa, concentraciones elevadas de fenoles inactivan esta actividad (Tomati *et al.*, 1991; Tsioulpas *et al.*, 2002).

Los residuos proveniente de la extracción del aceite de oliva son tóxicos para las plantas aunque gracias a la acción de los hongos saprobios pueden ser biotransformados y utilizados con fines industriales o agrícolas.

LITERATURA CITADA

- Aggelis, G., D. Iconomou, M. Christou, D. Bokas, S. Kotzailias, G. Christou, V. Tsagou y S. Papanikolaou. 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res.* 37: 3897-3904.
- Anselmo, A.M. y J.M. Novais. 1992. Biological treatment of phenolic wastes: comparison between free and immobilized cell systems. *Biotechnol. Lett.* 14: 239-244.
- Aranda, E., I. Sampedro, J.A. Ocampo y I. García-Romera. 2004. Contribution of hydrolytic enzymes produced by saprophytic fungi to the decrease in plant toxicity caused by water-soluble substances in olive mill dry residue. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 132-135.
- Ardón, O., Z. Kerem y Y. Hadar. 1996. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. *J. Biotechnol.* 51: 201-207.
- Arfmann, H.A. y A.W. Rainer. 1990. Microbial reduction of aromatic carboxylic acids. *Z. Naturforsch.* 40: 52-57.
- Atagana, H.I. 2004. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 845-849.
- Balice, V. y O. Cera. 1984. Acidic phenolic fraction of the olive vegetation water determined by a gas chromatography method. *Grasas y Aceites* 35: 178-180.
- Bezalel, L., Y. Hadar, P.P. Fu, J.P. Freeman y C.E. Cerniglia. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2554-2559.
- Blum, U., K.L. Staman, L.J. Flint y S.R. Shafer. 2000. Induction and/or selection phenolic acid-utilizing bulk-soil and rhizosphere bacteria and their influence on phenolic-acid phytotoxicity. *J. Chem. Ecol.* 26: 2059-2078.
- Bollag, J.M. y A. Leonowicz. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 849-854.
- Boominathan, K. y A. Mahadevan. 1989. Dissimilation of aromatic substances by fungi. *Zentralb. Microbiol.* 144: 37-45.
- Bucheli, P., S.H. Doares, P. Albersheim y A. Darvill. 1990. Host-pathogen interactions 36. Partial purification and characterization of heat-labile molecules secreted by the rice blast pathogen that solubilize plant cell wall fragments that kill plant cells. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 159-173.
- Camarero, S., G.C. Galletti y A.T. Martínez. 1994. Preferential degradation of phenolic lignin units by two white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4509-4516.
- Capasso, R., A. Evidente y C. Visca. 1994. Production of hydroxytyrosol from olive oil vegetation water. *Agrochimica* 38: 165-172.
- Capasso, R., G. Cristinzio, A. Evidente y F. Scognamiglio. 1992. Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste-waters. *Phytochemistry* 31: 4125-4128.
- Casa, R., A. D'Annibale, F. Pieruccetti, S.R. Stazi, G.G. Sermanni y B. Lo Cascio. 2003. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 50: 959-966.
- Caspersen, S., B.W. Alsanus, P. Sundin y P. Jensen. 2000. Bacterial amelioration of ferulic acid toxicity to hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Soil Biol. Biochem.* 32: 1063-1070.
- Chen, J., S.L. Fales, G.A. Varga y D.J. Royle. 1996. Biodegradability of free monomeric and cell-wall bound phenolic acids in maize stover by two strains of white-rot fungi. *J. Sci. Food Agric.* 71:

- 145-150.
- Chikamatsu, Y., H. Ando, A. Yamamoto, S. Kyo, K. Yamashita y K. Dojo. 1996. Hydroxytyrosol as melanin formation inhibitor and lipid peroxide formation inhibitor and its application to topical preparations and bath preparations. *Jpn. Patent* 8119825. pp. 1-10.
- Chou, C.H. y Z.A. Patrick. 1976. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *J. Chem. Ecol.* 2: 369-387.
- Crawford, D.L. y A.L. Pometto. 1988. Acid precipitable polymeric lignin production and analysis. *Method Enzymol.* 161: 35-47.
- Crestini, C., A. D'Annibale y G. Giovannozzi-Sermanni. 1996. Aqueous plant extracts as stimulators of laccase production in liquid cultures of *Lentinus edodes*. *Biotechnol. Tech.* 10: 243-248.
- D'Annibale, A., C. Crestini, V. Vinciguerra y G.G. Sermanni. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J. Biotechnol.* 61: 209-218.
- D'Annibale, A., R. Casa, F. Pieruccetti, M. Ricci y R. Marabottini. 2004a. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 54: 887-894.
- D'Annibale, A., M. Ricci, D. Quaratino, F. Federici y M. Fenice. 2004b. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Res. Microbiol.* 155: 596-603.
- Della Greca, M., P. Monaco, G. Pinto, A. Pollio, L. Previtera y F. Temussi. 2001. Phytotoxicity of low-molecular weight phenols from olive-mill waste waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 352-359.
- Deshpande, M.S., B.R. Vinay y J.M. Lynch. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14: 514-527.
- Eggert, C., U. Temp y K.E. Eriksson. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.
- Elisashvili, V.I., L.P. Daushvili, N.G. Zakariashvili, E.T. Kachlishvili, M.O. Kiknadze y K.A. Tusishvili. 1998. Effect of supplementary carbon sources and exogenous phenolic compounds on the lignocellulolytic system of *Cerrena unicolor* during the solid-state fermentation of grapevine cutting wastes. *Microb. (Moscow)* 67: 33-37.
- Felizón, B., J. Fernández-Bolaños, A. Heredia y A. Guillén. 2000. Steam-explosion pretreatment of olive cake. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 15-22.
- Fernández-Bolaños, J., B. Felizón, M. Brenes, A. Guillén y A. Heredia. 1998. Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1-7.
- Fernández-Bolaños, J., G. Rodríguez, R. Rodríguez, A. Heredia, R. Guillén y A. Jiménez. 2002. 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.
- Fiestas Ros de Ursinos, J.A. 1986. Vegetation water used as fertilizer. En: FAO (ed.) *International Symposium on Olive by Products Valorization*. Sevilla, España. pp. 321-330.
- Fiorentino, A., A. Gentili, M. Isidori, P. Monaco, A. Nardelli, A. Parrella y F. Temussi. 2003. Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1005-1009.
- Fountoulakis, M.S., S.N. Dokianakis, M.E. Kornaros, G.G. Aggelis y G. Lyberatos. 2002. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 36: 4735-4744.
- Galli, C. y F. Visioli. 1999. Antioxidant and other properties of phenolics in olives/olive oil, typical compounds of the mediterranean diet. *Lipids* 34:

- 23-26.
- Gianfreda, L., A. Decristofaro, M.A. Rao y A. Violante. 1995. Kinetic-behavior of synthetic organo-complexes and organo-mineral-urease complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59: 811-815.
- Giovanozzi-Sermanni, G., A. D'Annibale, G. Di Lena, N.S. Vitale, E. Di Mattia y V. Minelli 1994. The production of exoenzymes by *Lentinusedodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Biores. Technol.* 48: 173-178.
- Gramss, G., B. Kirsche, K.D. Voigt, T. Gunther y W. Fritsche. 1999. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol. Res.* 103: 1009-1018.
- Hamman, O.B., T. De la Rubia y J. Martínez. 1999. Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavid-alba*. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 2410-2415.
- Hammer, E. y F. Schauer. 1997. Fungal hydroxylation of dibenzofuran. *Mycol. Res.* 101: 433-436.
- Hartung, A.C., M.G. Nair y A.R. Putnam. 1990. Isolation and characterization of phytotoxic compounds from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) roots. *J. Chem. Ecol.* 16: 1707-1718.
- Ichinose, H., H. Wariishi y H. Tanaka. 1999. Bioconversion of recalcitrant 4-methylthiophene to water-extractable products using lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Progr.* 15: 706-714.
- Iyo, A.H. y S.P. Antai. 1988. Effects of different nitrogen sources on lignocellulose degradation and APPL production. *Lett. Appl. Microbiol.* 7: 75-78.
- Kissi, M., M. Mountadar, O. Assobhei, E. Gargiulo, G. Palmieri, P. Giardina y G. Sannia. 2001. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 221-226.
- Lafont, F., M.A. Aramendia, I. García, V. Borau, C. Jiménez, J.M. Marinas y E.J. Urbano. 1999. Analyses of phenolic compounds by capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Sp.* 13: 562-567.
- Linares, A., J.M. Caba, F. Ligeró, T. De la Rubia y J. Martínez. 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavid-alba*. *Chemosphere* 51: 887-891.
- Manna, C., P. Galletti, V. Cucciola, G. Montedoro y V. Zappia. 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.* 10: 159-165.
- Martirani, L., P. Giardina, L. Marzullo y G. Sannia. 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 30: 1914-1918.
- Mendonça, E., A. Martins y A.M. Anselmo. 2004. Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. *Electron. J. Biotechnol.* 7: 30-37.
- Moreno, E., J. Quevedo-Sarmiento y A. Ramos-Cormenzana. 1990. Antibacterial activity of easte waters from olive oil mills. En: P.N. Cheremisinoff (ed). *Encyclopedia of environmental control technology* Gulf Publishing Co., Houston. Estados Unidos. pp. 731-757.
- Mullen, J.M. y D.F. Bateman. 1975. Polysaccharide degrading enzymes produced by *Fusarium roseum avenaceum* in culture and during pathogenesis. *Physiol. Plant Pathol.* 6: 233-246.
- Okeke, B.C., A. Paterson, J.E. Smith y I.A. Watson-Craik. 1994. Relationships between ligninolytic activities of *Lentinula* spp and biotransformation of pentachlorophenol in sterile soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 284-287.
- Panagiotou, G., D. Kekos, B.J. Macris y P. Christakopoulos. 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Ind. Crops Products* 18: 37-45.

- Paredes, C., M.P. Bernal, J. Cegarra y A. Roig. 2002. Biodegradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultura wastes. *Biores. Technol.* 85 : 1-8.
- Perrin, J.L. 1992. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son fruit. *Rev. Fr. Corps Gras.* 39: 25-32.
- Piperidou, C.I., C.I. Chaidou, C.D. Stalikas, K. Soulti, G.A. Pilidis y C. Balis. 2000. Bioremediation of olive oil mill wastewater: Chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1941-1948.
- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.
- Ramos, J.L. y K.N. Timmis. 1987. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microbiol. Sci.* 4: 228-237.
- Rao, M.A., A. Violante y L. Gianfreda. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1007-1014.
- Regalado, V., F. Perestelo, A. Rodríguez, A. Carnicero, F.J. Sosa, G. De la Fuente y M.A. Falcón. 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 388-390.
- Rodríguez, A., F. Perestelo, A. Carnicero, V. Regalado, R. Pérez, G. De la Fuente y M.A. Falcón. 1996. Degradation of natural lignins and lignocellulosic substrates by soil-inhabiting fungi imperfecti. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21: 213-219.
- Rogalski, J., T. Lundell, A. Leonowicz y A. Hatakka. 1991. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiol. Pol.* 40: 221-234.
- Romero, C., M. Brenes, P. García y A. Garrido. 2002. Hydroxytyrosol-beta-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3935-3939.
- Ryan, D. y K. Robards. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst* 5: 31R-44R.
- Sampedro, I., E. Aranda, J. Marín, J.M. García-Garrido, I. García-Romera y J.A. Ocampo. 2004. Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *App. Soil Ecol.* 26: 149-156.
- Santos, V.L. y V.R. Linardi. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potential. *Process Biochem.* 39: 1001-1006.
- Saparrat, M.C.N., M.J. Martínez, H.A. Tournier, M.N. Cabello y A.M. Arambarri. 2000. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrate. *World J. Microb. Biotechnol.* 16: 799-803.
- Schoemaker, H.E., U. Tuor, A. Muheim, H.W.H. Schmidt y M.S.A. Leisola. 1991. White-rot degradation of lignin and xenobiotics. En: W.B. Betts (ed). *Biodegradation: natural and synthetic materials* Springer-Verlag, Berlín, Alemania. pp. 157-174.
- Szklarz, G.D., R.K. Antibus, R.L. Sinsabaugh y A.E. Linkins. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia* 81: 234-240.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.-UK* 140: 19-26.
- Tomati, U., E. Galli, G. Dilena y R. Buffone. 1991. Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil waste-waters. *Agrochimica* 35: 275-279.
- Tsioulpas, A., D. Dimou, D. Iconomou y G. Aggelis. 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biores. Technol.* 84: 251-257.
- Verhe, R., G. Papadopoulos y D. Boskou. 1992. Preparation of hydroxytyrosol. *Bull. Liason-Groupe Polyphenol* 15: 237-244.
- Vinciguerra, V., A. D'Annibale, G. Dellemonache y G.G. Sermanni. 1995. Correlated effects during

- the bioconversion of waste olive waters by *Lentinusedodes*. *Biores. Technol.* 51: 221-226.
- Vinciguerra, V., A. D'Annibale, E. Gacs-Baitz y G. Delle Monache. 1997. Biotransformation of tyrosol by whole-cell and cell free preparation of *Lentinusedodes*. *J. Mol. Catal. Part B (Enzymatic)* 3: 213-220.
- Visioli, F., F.F. Vinceri y C. Galli. 1995. Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia* 51: 32-34.
- Visioli, F., A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F.F. Vincieri y C. Galli. 1999. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3397-3401.
- Wang, T.S.C., T.K. Yang y T.T. Chuang. 1967. Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. *Soil Sci.* 103: 239.
- Wang, X., C. Sun, Y. Wang y L. Wang. 2002a. Quantitative structure-activity relationships for the inhibition toxicity to root elongation of *Cucumis sativus* of selected phenols and interspecies correlation with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere* 46: 153-161.
- Wang, X., J. Yu, Y. Wang y L. Wang. 2002b. Mechanism-based quantitative structure-activity relationships for the inhibition of substituted phenols on germination rate of *Cucumis sativus*. *Chemosphere* 46: 241-250.
- Yadav, J.S. y C.A. Reddy. 1992. Non-involvement of lignin peroxidases and manganese peroxidases in 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Lett.* 14: 1089-1092.



- 229 **CAPÍTULO 12**
Enzimas que intervienen en la formación y desarrollo de la simbiosis arbuscular
Mercedes García, Gloria Morales-Vela, José Manuel García-Garrido, Inmaculada García-Romera y Juan Antonio Ocampo
- 249 **PARTE III. USOS DE LOS HONGOS MICROSCÓPICOS**
- 251 **CAPÍTULO 13**
Potencial biológico y creatividad química de hongos microscópicos del trópico americano
M. Marcela Gamboa Angulo y Susana de la Rosa García
- 273 **CAPÍTULO 14**
Hongos entomopatógenos (HEP): evaluación en agricultura de zonas áridas del extremo norte de Chile
German F. Sepúlveda Chavera y Mónica A. Rojas Jara
- 293 **CAPÍTULO 15**
Transformación de los residuos procedentes del olivo mediante cepas fúngicas
Elizabet Aranda, Inmaculada Sampedro, Cesar Arriagada, Rosario Díaz, Mercedes García, Juan Antonio Ocampo e Inmaculada García-Romera
- 313 **CAPÍTULO 16**
Biodegradación de paja de trigo mediante cepas fúngicas
Eduardo Valenzuela F. y Dante Pinochet T.
- 327 **CAPÍTULO 17**
Implicancias funcionales de la enzima lacasa en la biología de los hongos y su potencial biotecnológico
Angélica Arambarri y Mario C. N. Saparrat
- 349 **CAPÍTULO 18**
Estudios sobre el metabolismo de hidrocarburos en hongos filamentosos
Roberto Zazueta-Sandoval, Areli Durón Castellanos, Hortencia Silva Jiménez, Vanesa Zazueta-Novoa, Yolanda Alvarado Caudillo, Carmen Rodríguez Robelo, Eduardo Peña Cabrera y Alfonso Cárabez Trejo