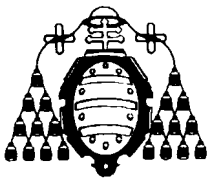

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

"TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA MEDIANTE EL EMPLEO DE HONGOS"

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

MARTA IBÁÑEZ LÁZARO

Junio, 2020

INDICE

RESUMEN I
ABSTRACT II
LISTA DE FIGURAS III
LISTA DE TABLAS VI
1. INTRODUCCIÓN 1
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS 3
2.1. INDUSTRIA ACEITERA 3
2.1.1. Importancia del sector aceitero en España 3
2.1.2. Procesos productivos 4
2.1.3. Impactos ambientales: análisis del ciclo de vida 7
2.2. RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ACEITERA 9
2.2.1. Principales residuos producidos 9
2.2.2. Tratamiento de aguas residuales 10
2.2.3. Valorización de residuos sólidos 12
2.3. LOS HONGOS EN EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS 16
2.3.1. *Phanerochaete chrysosporium* 16
2.3.2. Enzimas producidas por el hongo *P. chrysosporium* 19
2.3.3. Ejemplos de aplicación de *P. chrysosporium* en el tratamiento de residuos. 21
3. MATERIALES Y MÉTODOS 24
3.1. Muestra del residuo aceitero y pretratamiento 24
3.2. Microrganismo y obtención del inoculo 27
3.3. Ensayos de tratamiento con hongos 29
3.4. Toma de muestra 31
3.5. Métodos analíticos 32
3.4.1. Medida del pH 32
3.4.2. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) 32
3.4.3. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) 33
3.4.4. Biodegradabilidad 35
3.4.5. Determinación de carbohidratos reductores 35
3.4.6. Determinación de fenoles totales 36
3.4.7. Determinación del índice colorimétrico 37
3.4.8. Determinación del contenido en humedad, sólidos totales (SST), volátiles (SSV) y fijos (SSF) 38
4. RESULTADOS 39

4.1. Evolución del pH 39
4.2. Demanda Química de Oxígeno (DQO) 41
4.3. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) 44
4.4. Biodegradabilidad 45
4.5. Carbohidratos reductores 46
4.6. Fenoles totales 48
4.7. Índice colorimétrico 50
4.8. Sólidos totales 53
5. CONCLUSIONES 55
6. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS 56
7. BIBLIOGRAFÍA 57

RESUMEN

Los residuos de la industria del aceite de oliva son muy abundantes y contaminantes, debido principalmente a su elevado contenido en materia orgánica lignocelulósica y presencia de compuestos fenólicos. Se denomina alpeorujo al residuo semisólido obtenido mediante la extraccion en dos fases. Debido a la dificultad para tratarlo mediante métodos convencionales, una alternativa es someterlo a evaporación, siendo posible la valorización del residuo restante. Sin embargo, se trata de un método costoso medioambientalmente, por lo que se sigue trabajando en la búsqueda de nuevas alternativas.

Por otro lado, existen numerosos estudios que relacionan los hongos de podredumbre blanca presentes en la madera con la degradación de compuestos contaminantes complejos. La ventaja de estos hongos es la liberación extracelular de sus enzimas lignocelulósicas que pueden romper estos compuestos recalcitrantes.

Este trabajo analiza la posibilidad de emplear estos hongos de podredumbre blanca para el tratamiento del alpeorujo producido en la industria oleícola. El objetivo es evaluar la posibilidad de, *Phanerochaete chrysosporium,* para degradar el alpeorujo, analizando la posibilidad de mejora en la degradación del residuo si se adiciona una fuente de carbono fácilmente utilizable.

Para el estudio se realiza un ensayo de 10 días en el cual se cultiva el hongo con una muestra de alpeorujo diluido, en presencia y ausencia de glucosa. Los análisis realizados a las muestras tomadas durante el proceso muestran que, el tratamiento con *P. chrysosporium*, en condiciones óptimas de temperatura y pH, permite una importante degradación del residuo de alpeorujo, no siendo necesaria la adición de azúcar para activar al hongo. En tan solo 4 días de tratamiento se consigue reducir la DQO en porcentajes superiores al 60%.

ABSTRACT

Residues from production of olive oil are very abundant and pollutant, due to the great amount of lignocellulosic organic matter and the presence of phenolic compounds. An olive wet cake commonly known as “alpeorujo” is produced by a two-phase extraction. Due to the difficulty for treating this waste by conventional methods, an alternative is to evaporate the water, being possible to valorise the solid cake obtained. However, this method is expensive and needs a huge quantity of energy, so different alternatives are nowadays being investigated.

In addition, there are numerous studies focused on the use of white rot fungi, which are present in wood, to degrade recalcitrant and pollutant compounds. The main advantage of these fungi is their capability to release extracellular lignocellulosic enzymes that are able to break these recalcitrant compounds.

This study analyses the possibility of using these white rot fungi to treat alpeorujo produced in olive oil industry. The main objective is to evaluate the ability of *Phanerochaete chrysosporium* to degrade alpeorujo, analysing the possibility of improving the degradation of this residue by adding an easily utilizable carbon source.

In this study, the fungus is cultivated in diluted alpeorujo for 10 days, in presence and in absence of glucose. The analyses done to the samples taken during the process show that the treatment with *P. chrysosporium*, using optimum conditions of pH and temperature, enables an important degradation of the alpeorujo waste. Moreover, it is not necessary the addition of glucose in order to activate the fungus, and with only four days of treatment, a reduction in COD of 60% is reached.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de los aceites con Denominación de Origen Protegida en España……4
Figura 2. Diagrama del ciclo de vida del aceite de oliva……5
Figura 3. A) Extracción en 3 fases y B) Extracción en dos fases……6
Figura 4. A) Extractor en 2 fases: aceite y alpeorujo y B) Extractor en 3 fases: aceite, alpechín y orujo. ……7
Figura 5. Hongo *Phanerochaete chrysosporium* en la corteza de un árbol……16
Figura 6. Árbol filogenético del reino de los hongos …… 17
Figura 7. Hongo *Phanerochaete chrysosporium*……19
Figura 8. Rotura del enlace C_α-C_β de la lignina por parte de la LiP……20
Figura 9. Estructura tridimensional de LiP obtenida mediante el PDB (Protein Data Bank) ID:1B80 y estructura del grupo hemo……20
Figura 10. Reacción química catalizada por la enzima MnP …… 21
Figura 11. Estructura tridimensión de MnP obtenida mediante el PDB (Protein Data Bank) ID: 1mn1……21
Figura 12. Alpeorujo bruto …… 24
Figura 13. Dilución 1:20 …… 24
Figura 14. Sólidos obtenidos tras el tamizado ……25
Figura 15. A) Centrífuga utilizada para el pretratamiento; B) Filtración por quitasatos o por bomba de vacío …… 25
Figura 16. A) Alpeorujo tamizado sin centrifugar ni filtrar B) Alpeorujo tamizado, centrifugado y filtrado …… 26
Figura 17. Campana de flujo laminar empleada para el crecimiento del hongo y el ensayo……..27
Figura 18. Conservación de los pellets de P. chrysosporium en la disolución NaCl 0,8%, en nevera a 4ºC……28
Figura 19. Recogida de los pellets de P. chrysosporium de la disolución de NaCl al 0,8% para ser pesado y adicionar la cantidad exacta a cada matraz……..29
Figura 20. Incubador orbital en el que se realiza el crecimiento de P. chrysosporium y el ensayo de la muestra con el hongo. Mantiene las condiciones a 26ºC y una agitación de 135 rpm……30
Figura 21. Medición y ajuste de pH durante el ensayo……30

Figura 22. Centrifuga utilizada tras la toma de muestra …… 31
Figura 23. A) Digestor empleado; B) Espectrofotómetro en el que se ha acoplado un sistema que permite la medición de la absorbancia de la muestra directamente desde un tubo de vidrio ……. 33
Figura 24. A) Representación gráfica de las absorbancias de las muestras del calibrado frente a su concentración, indicando la ecuación y R^2 de la recta. B) Disoluciones patrón obtenidas …… 33
Figura 25. Equipos de medida para el análisis de DBO_5 de las muestras, en el interior de un incubador que mantiene la temperatura a 20ºC…… 34
Figura 26. A) Representación gráfica de las absorbancias de las muestras del calibrado frente a su concentración, indicando la ecuación y R^2 de la recta. B) Disoluciones patrón realizadas ……36
Figura 27. Baño utilizado, el cual se mantenía a 22ºC……...36
Figura 28. Recta de calibrado realizada con un patrón de ácido gálico …….37
Figura 29. Espectrofotómetro utilizado para la determinación del índice colorimétrico.38
Figura 30. Estufa utilizada para realizar peso seco de la muestra……38
Figura 31. Evolución del pH a lo largo del tratamiento. Se muestran las medias de los duplicados. En todos los casos se obtuvo una desviación estándar inferior al 4% del valor mostrado……. 39
Figura 32. Evolución de la demanda química de oxígeno durante el tratamiento. Se muestran los valores medios de los duplicados. Todos los valores de desviación estándar son inferiores al 6,5% …… 41
Figura 33. DBO_5 en el momento inicial, intermedio y final del ensayo. Se muestran los valores medios de los duplicados. Las desviaciones estándar fueron en todos los casos inferiores al 26,5% del valor ……44
Figura 34. Biodegradabilidad en el momento inicial, intermedio y final del ensayo …45
Figura 35. Evolución de la concentración de carbohidratos reductores durante el tratamiento. Se representan los valores medios de los duplicados. En todos los puntos el valor de la desviación estándar es menor al 11%…… 46
Figura 36. Valor de los fenoles totales en el momento inicial y final del ensayo. Se representan los valores medios de los duplicados. Todos los valores de la desviación estándar son menores al 11%……48

Figura 37. Apariencia del residuo durante el ensayo realizado……50
Figura 38. Evolución del índice colorimétrico durante el tratamiento. Se representan los valores medios de los duplicados. Todos los valores poseen una desviación estándar menor al 11,5%……51
Figura 39. Incremento del peso seco de la muestra tras el tratamiento. Se representan los valores medios de los duplicados. La desviación estándar en todos los casos es inferior al 6% ……...53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Balance de materia y energía en los tres sistemas de elaboración de aceite de oliva …… 10

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *P. chrysosporium*……18

Tabla 3. Caracterización físico-química de la muestra inicial utilizada en los ensayos de biodegradación…… 26

Tabla 4. Preparación del reactivo DNS …… 35

Tabla 5. Porcentajes de degradación de DQO (respecto a la DQO del control sin suplementar)…… 42

Tabla 6. Porcentajes de degradación de fenoles totales…… 48

Tabla 7. Porcentajes de degradación del color al final del tratamiento……51

Tabla 8. Porcentaje de aumento de peso durante el tratamiento con respecto al peso inicial……...53

Tabla 9. DQO consumida por gramo de microrganismo formado……..54

1. INTRODUCCIÓN

Los efluentes de la industria del aceite de oliva son residuos con una elevada carga de contaminación debido a sus constituyentes y su concentración. Son difíciles de tratar por métodos aeróbicos convencionales debido a la alta dilución requerida y al alto consumo de energía y producción de lodos (Rozzi et al. 1997). Además de la complejidad de estos residuos, otro de los problemas principales reside en la abundancia de los mismos. La industria aceitera genera aproximadamente de 10 a 12 millones de metros cúbicos de aguas residuales anuales, cantidad muy elevada (Messineo et al. 2019).

Son tres los principales residuos obtenidos dependiendo del proceso de producción del aceite: el alpechín, el orujo y el alpeorujo.

El orujo no presenta un problema medioambiental ya que, tras obtener el aceite de orujo en la orujera, se obtiene como subproducto solido el orujillo, que se emplea como combustible tanto en la propia orujera como en las almazaras u otras industrias. Este orujillo obtenido puede ser utilizado como abono orgánico o en la fabricación de compost, mezclado con otros subproductos agrícolas (Ramos, 1986), o como alimentación animal (Martínez, 2018).

Sin embargo, el alpechín es un residuo producido en grandes cantidades, y con una carga contaminante muy elevada (alta DBO_5 y corto periodo de producción). Tras su evaporación, lo que supone un importante gasto energético, los lodos obtenidos pueden ser destinados para uso agronómico con valor fertilizante, como el compostaje (Montaño, et al. 1986).

En el caso del alpeorujo, el residuo obtenido tras el secado se puede utilizar principalmente como combustible para la generación de energía, o como fertilizante (Mendoza, 1994).

Por ello, actualmente se realizan diversos tratamientos a dichas aguas ya que está prohibido su vertido sin tratamiento. En la mayoría de ellos se consume gran cantidad de energía, por lo que se han investigado varias alternativas que hagan más viable la gestión de estos residuos. Por ejemplo, se puede realizar digestión anaerobia, compostaje o producción de biodiesel a partir de residuos oleícolas. Algunos tratamientos son más ambiciosos, como es el hecho de emplear ciertos compuestos obtenidos de los residuos en la realización de fármacos, o incluso obtener enzimas o compuestos para alimentación animal a partir de los mismos.

Una propuesta diferente es el uso de microrganismos como los hongos en el tratamiento de dichos residuos, que puede resultar beneficioso debido a que secretan enzimas especificas al medio, que degradan compuestos recalcitrantes. De esta manera, los hongos liberan al medio compuestos más sencillos, que pueden ser utilizados por los propios hongos o por las bacterias en un tratamiento posterior. Esto hace viable que el tratamiento con hongos pueda ser considerado como un pretratamiento.

Como en los residuos aceiteros abundan estos compuestos lignocelulósicos, son una opción interesante a considerar en su tratamiento. En este caso, el estudio se centra en el empleo del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo de podredumbre blanca que es capaz de degradar la lignina presente en la madera debido a la liberación de enzimas, principalmente lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa (Syed et al. 2012).

De esta manera, el tratamiento con este hongo podría ser el paso previo a la digestión anaerobia, el compostaje u otros tratamientos de valorización.

El objetivo de este proyecto es investigar la posibilidad de tratar las aguas residuales de la industria aceitera mediante el empleo del hongo, *P. chrysosporium*, para disminuir la carga orgánica y/o aumentar la biodegradabilidad de las mismas.

Con este fin se partirá de un agua residual preparada a partir de alpeorujo, procedente de una industria aceitera, diluido con agua en una relación 1:20 y se inoculará el hongo, analizando la evolución del contenido en materia orgánica.

Como en estudios previos se ha demostrado que se trata de un hongo que actúa mejor tras la suplementación de nutrientes, como azucares, se van a realizar dos ensayos distintos para compararlo. Uno de ellos constará de la adición exclusiva del hongo al agua residual, y en el otro ensayo, además del hongo, se adicionará glucosa como fuente de carbono para valorar su efecto en la degradación.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. INDUSTRIA ACEITERA

2.1.1. Importancia del sector aceitero en España

La principal región productora de aceite de oliva es la cuenca mediterránea con más del 90% de la producción mundial, destacando la Unión Europea con un 75,8%, junto con otros países como Túnez, Siria o Turquía. Debido a sus condiciones climáticas específicas, la región Mediterránea concentra el 98% del total de olivos del mundo, siendo aproximadamente 900 millones de árboles en 10 millones de hectáreas de tierra (Messineo et al. 2019). El rendimiento graso es mayor en los países del sur del mediterráneo, donde se ha cultivado tradicionalmente el olivo, reduciéndose drásticamente en países sudamericanos (International Olive Oil Council). El sector aceitero está regulado por el International Olive Oil Council (IOC), una organización internacional intergubernamental con sede en España.

España es el principal país productor de aceite de oliva, con 1.598.900 toneladas producidas en 2018, frente a 3.131.000 toneladas mundiales, lo que representa un 51% de la producción mundial (IOC, 2018). Por ello, la industria del aceite de oliva es uno de los sectores agroalimentarios más importantes en España.

Dentro de España, la región que concentra la mayoría de la producción de aceite de oliva es Andalucía, con el 75% de la producción española. Además, posee el área más grande de olivos en el mundo, árboles termófilos de la especie *Olea europaea* (Ramos-Román et al. 2019). La producción de aceite de oliva en Andalucía aumenta desde los últimos dos siglos, con 65.000 toneladas producidas en 1849, más de 300.000 toneladas en 1980, y un millón de toneladas en los últimos años (Web 4). Estos periodos de crecimiento se intercalan con periodos de menor producción que se asocian a disminuciones en la producción de olivas debido al cambio climático (Ramos-Román et al. 2019). Además, se espera un incremento en la producción de aceite de oliva en los próximos años. Se prevé que se aumente la demanda en los países de la UE no productores, favoreciendo un incremento en las exportaciones (European Comission, 2019), lo que aumentará la producción en España.

Además, el aceite de oliva en España cuenta con 29 Denominaciones de Origen Protegidas (DOP), siendo uno de los alimentos de calidad diferenciada más importantes

del país (Web 5). De las 29 DOP, 12 de ellas se concentran en la región andaluza, tal y como indica la *Figura 1*.

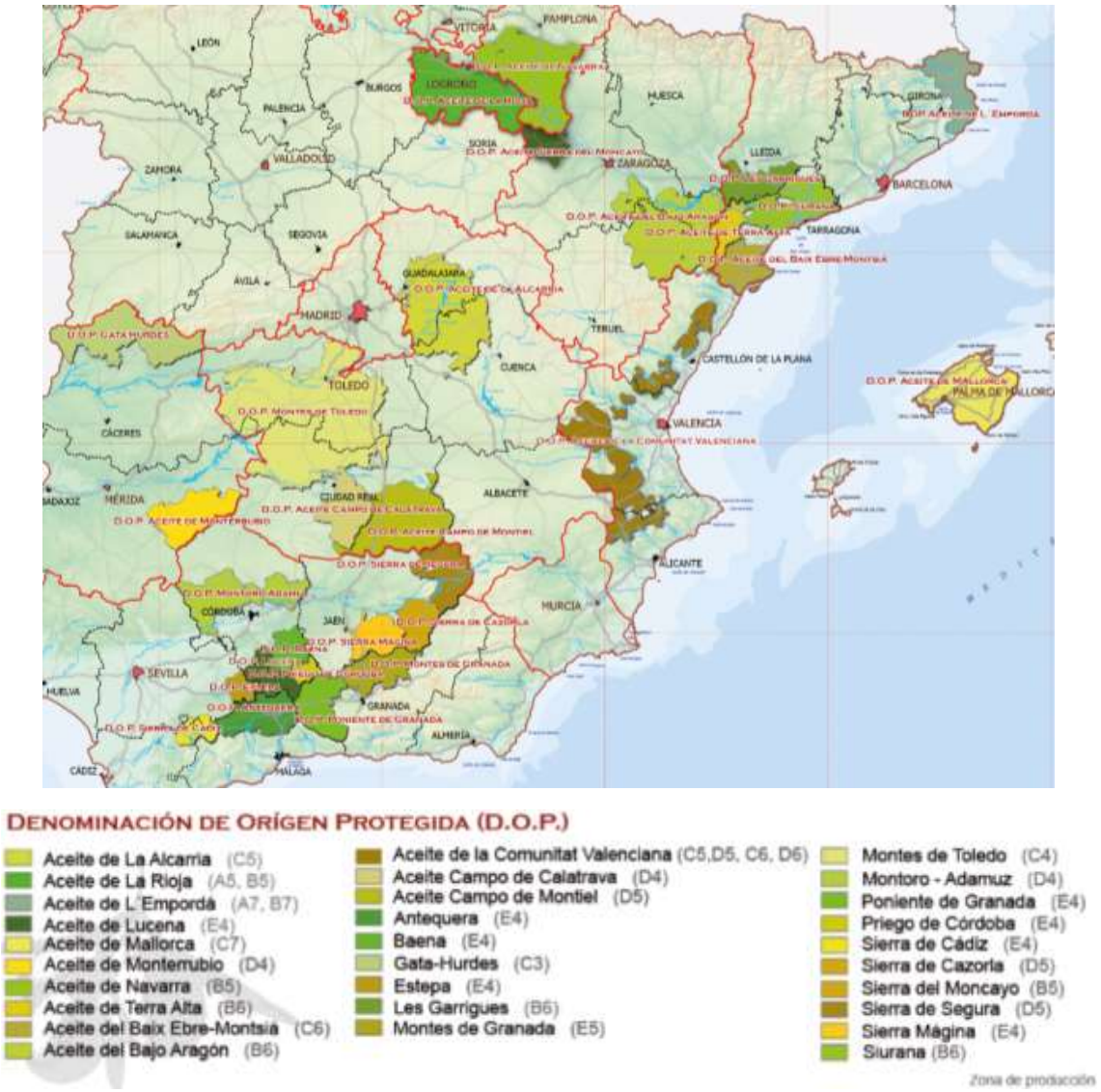

***Figura 1**. Mapa de los aceites con Denominación de Origen Protegida en España (Web 5)*

2.1.2. Procesos productivos

El ciclo de vida de una industria aceitera pasa por diversas fases: una fase de cultivo de las olivas, otra de producción del aceite de oliva en una almazara, y tras las fases de empaquetado, distribución y consumo, una última fase de tratamiento de los residuos generados, tal y como muestra la *Figura 2* (Espadas-Aldana et al. 2019).

El proceso de producción del aceite de oliva consta del deshojado y lavado de las aceitunas, su trituración y batido, la extracción y por último la separación. De esta manera

se eliminan las impurezas y se mantiene intacta la pulpa de la aceituna. Después de la extracción es cuando se obtienen los principales residuos de la industria (Espadas-Aldana et al. 2019).

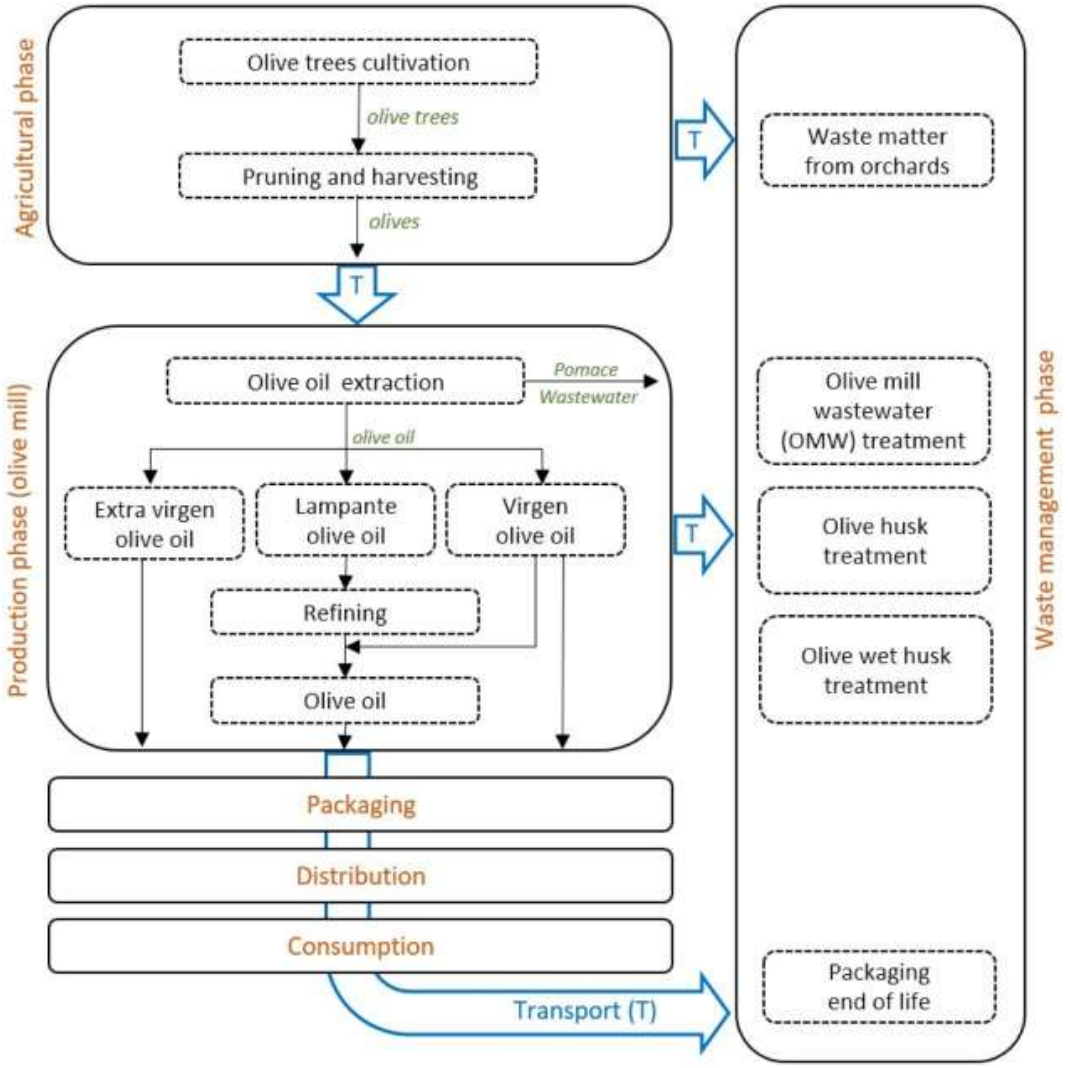

Figura 2. *Diagrama del ciclo de vida del aceite de oliva (Espadas-Aldana et al. 2019).*

Existen tres sistemas distintos de producción de aceite de oliva que utilizan diferentes métodos de extracción. El más antiguo de todos es el método tradicional, un método en el que se trabaja en discontinuo y por esta razón ha sido desplazado por los métodos continuos. Existen dos métodos continuos de producir aceite de oliva: el sistema de extracción en tres fases y el de extraccion en dos fases. En el primero de todos se obtiene el aceite junto con dos residuos: el alpechín o agua residual y el orujo, un residuo sólido. En cambio, en el sistema de extracción en dos fases obtenemos el aceite y un único

residuo sólido, el alpeorujo. Los diagramas de flujo de estos métodos de extracción en continuo están representados en la *Figura 3* (Carrera et al. 2019).

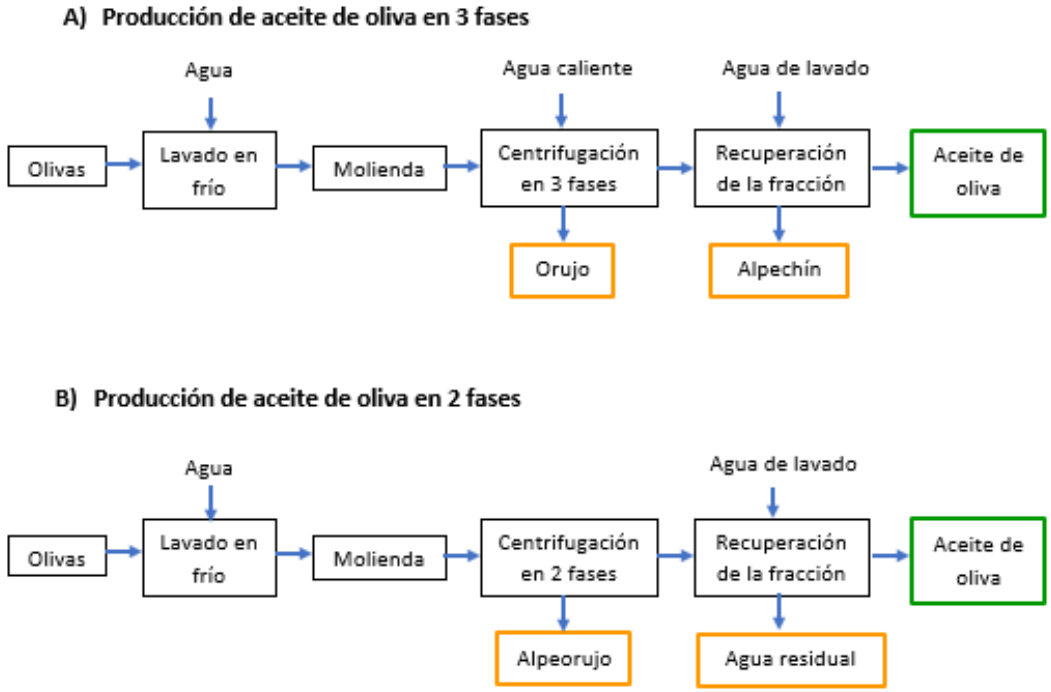

Figura 3. *A) Extracción en 3 fases y B) Extracción en dos fases*

Para realizar estos dos tipos de extracciones distintas, se precisan extractores diversos. En el extractor en dos fases la centrífuga tiene dos salidas: una para el aceite, y otra para el residuo sólido o alpeorujo, que salen por zonas contrarias del extractor, como se indica en la *Figura 4* A). En cambio, en el extractor de 3 fases hay un decantador que separa las dos fases líquidas, el aceite y el agua residual o alpechín, que son descargadas por la misma parte del extractor. El orujo o parte sólida es descargada por la parte contraria del mismo, como se indica en la *Figura 4* B) (Web1).

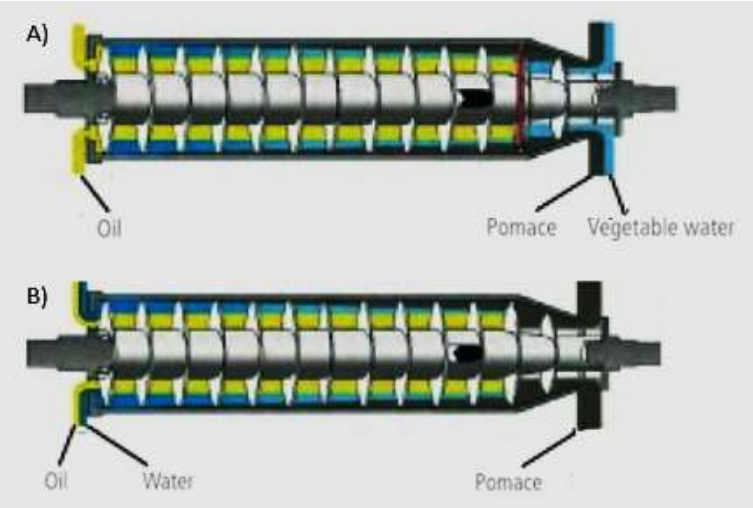

Figura 4. *A) Extractor en 2 fases: aceite y alpeorujo y B) Extractor en 3 fases: aceite, alpechín y orujo. (Web 1)*

2.1.3. Impactos ambientales: análisis del ciclo de vida

Como ya se ha indicado previamente, la producción de aceite de oliva, sea en el sistema tradicional, en el sistema de dos fases o en el de tres fases, genera una gran cantidad de residuos: aguas residuales, como alpechín y alpeorujo, y residuos sólidos, como el orujo (Carrera et al. 2019).

Los residuos sólidos se pueden valorizar para ser utilizados en otras industrias y poder darles un uso adicional. En cambio, la problemática se centra en las aguas residuales, altamente contaminantes ya que poseen una elevada carga orgánica.

Como se indica en el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas, queda prohibido el vertido de aguas y de productos residuales susceptibles de contaminar las aguas continentales o cualquier otro elemento del dominio público hidráulico, salvo que se cuente con la previa autorización administrativa. Por ello, debido a la gran importancia del sector, es muy importante conocer los residuos generados. En España, se generan cada año más de 1 millón de metros cúbicos de aguas residuales procedentes de almazaras, solo en el proceso del lavado de la aceituna (Carrara et al. 2019). Las aguas residuales presentan una elevada carga orgánica por lo que deben ser tratadas previamente para evitar la eutrofización de las aguas y la contaminación del ambiente, pudiendo así ser vertidas a aguas continentales.

Debido a la necesidad de una producción y un consumo sostenible, se han incrementado los estudios LCA, Life Cycle Assessment o análisis del ciclo de vida, una metodología utilizada para evaluar los potenciales impactos de un producto durante todas sus etapas. Aplicando el LCA a esta industria se consideran como principales impactos ambientales el cambio climático, la acidificación, eutrofización, eco-toxicidad, uso de la tierra y uso del agua. Estos impactos varían significativamente dependiendo de las técnicas de cultivo y producción, y dependiendo del país o región donde se realice. El conocimiento de los impactos medioambientales de esta industria es fundamental para aplicar diferentes prácticas agrícolas y de producción, así como una correcta gestión de los residuos generados. Lo que más afecta a todos los impactos es el uso de fertilizantes, por lo que su disminución tendría una mejora ambiental considerable. Por otra parte, los sistemas de cultivo intensivos y super intensivos utilizan volúmenes de agua mayores, mayor consumo de energía, y mayor cantidad de fertilizantes y pesticidas añadidos. A pesar de la alta productividad obtenida mediante estos sistemas, se deberían diseñar para minimizar el impacto ambiental de su mecanización (Guarino et al. 2019).

Para conseguir una producción de olivas más sostenible se pueden utilizar fertilizantes orgánicos, como puede ser el uso de un co-compost producido a partir de los propios residuos de esta industria junto con estiércol y otros fertilizantes orgánicos. Así se contribuye a la reducción del uso y producción de fertilizantes químicos, y se mejora el tratamiento de estos residuos industriales (Salomone et al. 2012).

Por otro lado, el empaquetado del aceite contribuye al elevado impacto ambiental de esta industria. Envases de cristal o en lata producen un mayor impacto ambiental que aquellos producidos con PET (Guarino et al. 2019).

2.2. RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ACEITERA

2.2.1. Principales residuos producidos

Como ya se ha indicado, la gran cantidad de residuos generados en un tiempo relativamente corto es uno de los problemas principales de esta industria. Se ha estimado que se producen aproximadamente 10-12 millones de metros cúbicos de aguas residuales al año (Messineo et al. 2019). Sin embargo, el cálculo de la producción anual de deshechos es muy incierto, ya que en los últimos años se datan oscilaciones tanto en la producción como en la cantidad de residuos generados, que se debe a la variable cantidad de aceitunas cosechadas cada año en función de las condiciones climáticas (Messineo et al. 2019; Carrera et al. 2019).

Tanto el sistema tradicional como el continuo de tres fases generan una gran cantidad de alpechines, compuestos por una gran cantidad de agua (94 y 97% respectivamente). Ambos alpechines presentan valores de pH similares, siendo la demanda química de oxigeno (DQO) como la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) mayor en el sistema tradicional, por lo que presenta una mayor carga contaminante. El sistema de tres fases es, en cambio, el que más agua consume durante el proceso, como se indica en la *Tabla 1*, hasta 1000 litros de agua más por cada tonelada de aceituna, en comparación con otros sistemas.

La composición del agua residual producida (alpechines) es muy variable, y depende del tipo de aceituna, proceso de cultivo, tiempo de almacenamiento de la aceituna, clima y proceso de elaboración del aceite. Los alpechines además de agua poseen de forma mayoritaria compuestos fenólicos, azúcares y otros compuestos orgánicos, conteniendo a su vez minerales, especialmente potasio (Carrera et al. 2019).

En cuanto al sistema de dos fases, la cantidad de alpeorujo generada es mucho menor, por lo que es un sistema más eficiente, generando menos residuos y consumiendo menos cantidad de agua. En este tipo de extracción se reduce o se elimina el uso de agua de proceso, con la doble ventaja de reducir el uso de recursos naturales (agua) y reducir o eliminar la producción de aguas residuales, cuya eliminación incide considerablemente en los costes de gestión de la almazara (Web 1).

Sin embargo, el alpeorujo es un residuo de consistencia pastosa, mucho más difícil de degradar que el orujo. Está constituido por un 61,5% de agua, un 35,5% de solido seco y un 3% de aceite. Como la carga contaminante está más concentrada, es un residuo más

difícil de tratar, y debido a ello en algunas ocasiones se siguen utilizando los anteriores métodos (Carrera et al. 2019).

Tabla 1. *Balance de materia y energía en los tres sistemas de elaboración de aceite de oliva.*

Sistema	Entradas	Cantidad	Salidas	Cantidad
Tradicional	Aceituna	1 Tn	**Aceite**	200 kg
	Agua de lavado	100-120 L	**Orujo** (26% agua, 7% aceite)	400 - 600 kg
	Energía	40-60 kW/h	**Alpechines** (88% agua)	400 - 600 L
3 fases	Aceituna	1 Tn	**Aceite**	200 kg
	Agua de lavado	100-120 L	**Orujo** (40% agua, 4% aceite)	500 - 600 kg
	Agua añadida	800-1.000 L	**Alpechines** (94% agua, 1% aceite)	1.000 - 1.200 L
	Energía	90-117 kW/h		
2 fases	Aceituna	1 Tn	**Aceite**	200 kg
	Agua de lavado	100-120 L	**Alpeorujo** (61,5% agua, 3% aceite)	800 kg
	Energía	<90-117 kW/h	Agua limpieza aceite	100 - 150 L

Fuente*: (Carrera et al. 2019)*

2.2.2. Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de las aguas residuales procedentes de la industria del aceite de oliva es obligatorio, siendo además uno de los residuos agroalimentarios más contaminantes. Dentro de estas aguas residuales se puede incluir tanto el alpechín como el alpeorujo, el cual posee más de un 60% de agua. Estos residuos sin tratar producirían daños severos en el sistema acuático, como la reducción del oxígeno soluble y un cambio de color de las aguas. Además, su fuerte olor también causaría problemas serios para la población que vive cerca de estas aguas (Lee et al. 2019).

La gran problemática respecto a la gestión de estas aguas residuales se debe, en gran parte, a su elevado contenido en polifenoles, extremadamente tóxicos tanto para células animales, como para vegetales, insectos y microrganismos. Esto, junto con la presencia de compuestos lignocelulósicos difícilmente degradables hace que el alpechín, el alpeorujo y otras aguas de proceso obtenidas sean tan contaminantes (Ramos-Comerzana et al. 2000).

Dos posibles tratamientos de las aguas residuales son la digestión anaerobia y el tratamiento aeróbico de los mismos.

2.1.1.1. Digestión anaeróbica

La degradación de las aguas residuales producidas tras la obtención del aceite de oliva se dificulta debido a la presencia de moléculas recalcitrantes, una baja carga de nutrientes y un pH ácido. Hay estudios que intentan mejorar su degradación añadiendo nutrientes, corrigiendo el pH y diseñando reactores más apropiados. Por ejemplo, se han demostrado beneficios potenciales tras la adición de cobalto en el digestor (Pinto-Ibieta et al. 2016), y añadiendo $CaCO_3$, que actúa como un soporte físico para la biomasa durante la descomposición y mejora el crecimiento de las bacterias metanogénicas y de agregados microbianos que actúan a modo de buffer, reduciendo la acidez del residuo (Battista et al., 2014). También se ha demostrado que la aclimatación de la biomasa mejora el proceso de biodegradación y metanización de los residuos oleosos (Messineo et al. 2019).

La digestión anaerobia realizada con estos residuos difícilmente biodegradables necesita por tanto unos pretratamientos con el fin de favorecer la hidrolisis del complejo lignocelulósico y así descomponer su estructura química. La lignina es un obstáculo para la descomposición enzimática. La hidrolisis es la etapa limitante de la digestión anaerobia por lo que realizar un pretratamiento mejora significativamente la eficiencia del proceso. Los pretratamientos pueden ser de diversos tipos: físicos, químicos, fisicoquímicos, biológicos, o una combinación de ellos. El pretratamiento mecánico reduce el tamaño de partícula para aumentar la superficie de contacto con los microrganismos degradadores, pero se suele combinar con pretratamientos químicos o biológicos. Los pretratamientos químicos solubilizan lignina y hemicelulosa para favorecer las reacciones enzimáticas e incrementar la producción de biocombustibles. Suelen involucrar compuestos ácidos, básicos u oxidantes. Los pretratamientos biológicos incluyen cepas de hongos o bacterias con capacidad de degradar la lignina (Messineo et al. 2019).

Una vez realizado el pretratamiento, se añade el inoculo en condiciones anaerobias para llevar a cabo la digestión anaerobia, produciendo biogás de manera económica y satisfactoria, permitiendo un sistema de cogeneración. Simultáneamente a la generación del biogás, el vapor que se produce se utiliza para generar electricidad en una turbina de vapor.

2.1.1.2. Tratamiento aeróbico

Los tratamientos aerobios tradicionales tipo fangos activos no dan buenos resultados para el tratamiento directo de la mayor parte de los efluentes de la industria aceitera. Sin embargo, la capacidad de ciertos microrganismos aerobios de crecer en alpechines diluidos es una opción interesante a aplicar como pretratamiento para reducir la toxicidad y la carga orgánica de este residuo. Estos microrganismos pueden ser hongos, entre los que destacan *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Geotrichum candidum*, *Azotobacter chroococcum* y *Phanerochaete chrysosporium*, del cual se hablará en profundidad más adelante (Fadil et al. 2003).

Además de los hongos, la degradación aeróbica se puede realizar también con bacterias. Se han visto buenos resultados de degradación de alpechines de bacterias del género *Alcaligenes* y *Acinetobacter*, con adición de un medio de nutrientes. Estos residuos se pueden tratar mediante diversos métodos, como reactores de leche fluidizado o reactores flash (Tziotzios et al. 2007).

También es interesante la combinación conjunta de bacterias y hongos para optimizar la biodegradación aerobia de los alpechines. Un ejemplo de ello es la utilización de conjunta de 9 líneas entre las que destacan *Aeromonas salmonicidae*, *Penicillium sp*., *Cryptococcus humicolus*, *Bacillus sp*., *Candidae boidiini* y *Staphylococcus xylosus*. Durante 4 días de tratamiento se obtuvo una reducción en el color del residuo del 90% y una bajada del 86% de la DQO. Estos resultados muestran el potencial de la aplicación conjunta de diferentes microrganismos para un tratamiento aeróbico más eficaz (Ayed et al. 2019).

2.2.3. Valorización de residuos sólidos

Existen diferentes metodologías para la valorización de las aguas residuales y de residuos sólidos. Entre ellas, destacan la producción de biodiesel, el compostaje y el potencial biofarmacéutico de dichos residuos.

2.2.3.1. Producción de biodiesel

La producción de biodiesel se lleva a cabo con un residuo sólido, compuesto por 6-9% de aceite, 42-45% hueso de olivas, 21-33 % de pulpa y 10-11% de piel. Este residuo se somete a un proceso de esterificación para obtener el biodiesel, para lo que se necesita la adición de un catalizador y alcanzar una temperatura de hasta 65ºC. El biodiesel

producido con residuos de aceite de oliva no tiene las mismas características que el diésel producido a partir de combustibles fósiles. Este biodiesel posee cadenas moleculares más largas, mayor viscosidad y un punto de inflamabilidad menor, lo que se traduce en una menor eficiencia. Para solucionar este problema se han probado varias alternativas, siendo una de ellas la adición de manganeso, dando buenos resultados (Çaynak et al. 2009).

2.2.3.2. Compostaje

Tanto el alpechín como el alpeorujo se puede tratar mediante compostaje.
Se ha investigado que mezclando el alpeorujo con otros residuos con elevado contenido en nitrógeno, como el estiércol o los lodos de depuradora, se obtiene un producto final o "vermicompost de alpeorujo" que cumple con la normativa española y de la Unión Europea frente al contenido en principios activos exigibles y el nivel máximo de metales pesados en la agricultura convencional (Orden 28 de Mayo 1998 sobre fertilizantes y afines) y en la ecológica (Reglamento CE 1488/97). De esta manera, la materia orgánica se descompondrá debido a la fermentación aeróbica, formando compuestos orgánicos de fácil asimilación para los terrenos, por lo que puede ser utilizado como abono de una forma limpia y sostenible (Nogales et al. 2007).
Sin embargo, los residuos aceiteros poseen una elevada cantidad de compuestos fenólicos que hacen que posean propiedades fitotóxicas y antimicrobianas. Una vez se eliminan estos compuestos, la aplicación de los residuos al terreno es positiva debido a su elevado contenido en agua, materia orgánica y nutrientes apropiados para las plantas. Para ello se pueden llevar a cabo tratamientos aeróbicos con hongos, como *Phanerochaete chrysosporium*, que pueden catabolizar estos compuestos aromáticos, degradando tanto los compuestos fenólicos como los lignocelulósicos, mediante enzimas como lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa. Además de estos hongos, también se ha visto que ciertas levaduras, microalgas y bacterias aerobias también reducen estos compuestos significativamente (Dermeche et al. 2013).

2.2.3.3. Potencial biofarmacéutico

Los polifenoles presentes en estos residuos, además de poder ser degradados, también se pueden recuperar mediante procesos de extracción y purificación, habiendo investigaciones abiertas sobre el potencial antioxidante de compuestos como el

hidroxitirosol. Además, también son de interés farmacéutico los ácidos oleanoico y maslínico obtenidos del alpechín, los cuales poseen incluso una patente respecto a su recuperación industrial. El ácido oleanoico posee propiedades interesantes, como la reducción del colesterol y la regulación del peso corporal. El ácido maslínico posee acciones antiinflamatorias y es activador de neuronas, y actualmente se está investigando su aplicación en el tratamiento frente al VIH.

Además, se pueden extraer polihidroxialcanoatos (PHA) de los alpechines, los cuales poseen interés farmacéutico y biomédico. Los PHA son compuestos bastante caros, pero el hecho de ser obtenidos a partir de alpechín aumenta su viabilidad. Se sugiere su aplicación como envase en productos farmacéuticos, en la preparación de microcápsulas o nanocápsulas, e incluso en ingeniería tisular (Ramos-Comerzana et al. 2000).

2.2.3.4. Medio de cultivo

Los alpechines son un buen medio de cultivo para especies fúngicas que pueden producir compuestos de alto valor añadido. Un ejemplo de ello puede ser la producción de enzima lipasa por parte de *Aspergillus ibericus*, cultivado en placas con una mezcla de alpechín y agar (Abrunhosa et al. 2012). El alpeorujo también puede ser utilizado como medio de cultivo de determinados microrganismos para producir compuestos de interés. Un ejemplo de ello es el crecimiento de *Microbacterium sp.* y su producción de caroteno a partir del alpeorujo (Borroni et al. 2017). Otro ejemplo es el uso de alpechín para la producción de biosurfactantes, a través de la fermentación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Estos biosurfactantes (ramnanolípidos y surfactina) tienen ventajas respecto a los surfactantes sintéticos, como su producción con fuentes biodegradables, la posibilidad de su uso en condiciones extremas, y una mejor compatibilidad y biodegradabilidad (Moya-Ramirez et al. 2016).

2.2.3.5. Colorante en la industria textil

Existen estudios recientes para tratar de encontrar nuevas formas de reutilización del alpechín, se estudian formas de aplicación en la industria textil. Se encontraron formas de utilizarlo como colorante natural, debido a los pigmentos que se encuentran en él. Las proteínas de las fibras poseen una gran afinidad con los pigmentos que se encuentran en el alpechín, consiguen una gran solidez del color (Meksi et al. 2012).

2.2.3.6. Alimentación animal

Los residuos sólidos también pueden ser aprovechados como alimentación animal, sustituyendo al heno. Se recomienda mezclarlos con aproximadamente un 50% de pienso, y con el orujo deshuesado o molido. Se ha visto que puede incluso aumentar la calidad de la carne de cerdos, y reducir costes en la industria porcina (Martínez Torres, 2018).

2.3. LOS HONGOS EN EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Los hongos poseen multitud de aplicaciones industriales, tanto en producción de alimentos y fármacos como en biorremediación.

Un tipo de hongos muy estudiados son los hongos de la podredumbre blanca, que poseen enzimas oxidativas que degradan lignina, relacionadas con componentes encontrados en materiales contaminantes explosivos, pesticidas y compuestos tóxicos. Estos hongos degradan la lignina marrón, dejando al descubierto la celulosa blanca, a diferencia de los hongos de podredumbre parda que degradan la celulosa dejando al descubierto la lignina. La lignina juega un papel importante en el ciclo del carbono ya que es el compuesto aromático más importante en la naturaleza, formando parte de una matriz protectora de las microfibrillas de celulosa en la pared celular de las células vegetales. Este polímero complejo, amorfo e insoluble carece de estereorregularidad, y a diferencia de la celulosa y hemicelulosa no es hidrolizable en condiciones biológicas. Sin embargo, la lignina es el sustrato ideal para los hongos de podredumbre blanca, los cuales son los únicos microrganismos capaces de despolimerizar y mineralizar la lignina. Todos ellos son basidiomicetos, un grupo de hongos que incluye tanto a champiñones comestibles como a patógenos de plantas (Ohm et al. 2014). Por ello, estos hongos podrían resultar otra alternativa en el tratamiento de los residuos industriales de difícil tratamiento, como pueden ser los procedentes de la industria aceitera.

2.3.1. *Phanerochaete chrysosporium*

***Figura 5**. Hongo Phanerochaete chrysosporium en la corteza de un árbol*

Dentro de los basidiomicetos, *Phanerochaete chrysosporium* es el hongo más estudiado. Posee un genoma de treinta millones de pares de bases y 13.602 genes, y es el primer basidiomiceto con el genoma secuenciado. Como se ha indicado previamente, es un hongo de la podredumbre blanca que se encuentra en la madera ya que posee la habilidad de degradar la lignina a CO_2 (Syed et al. 2012).

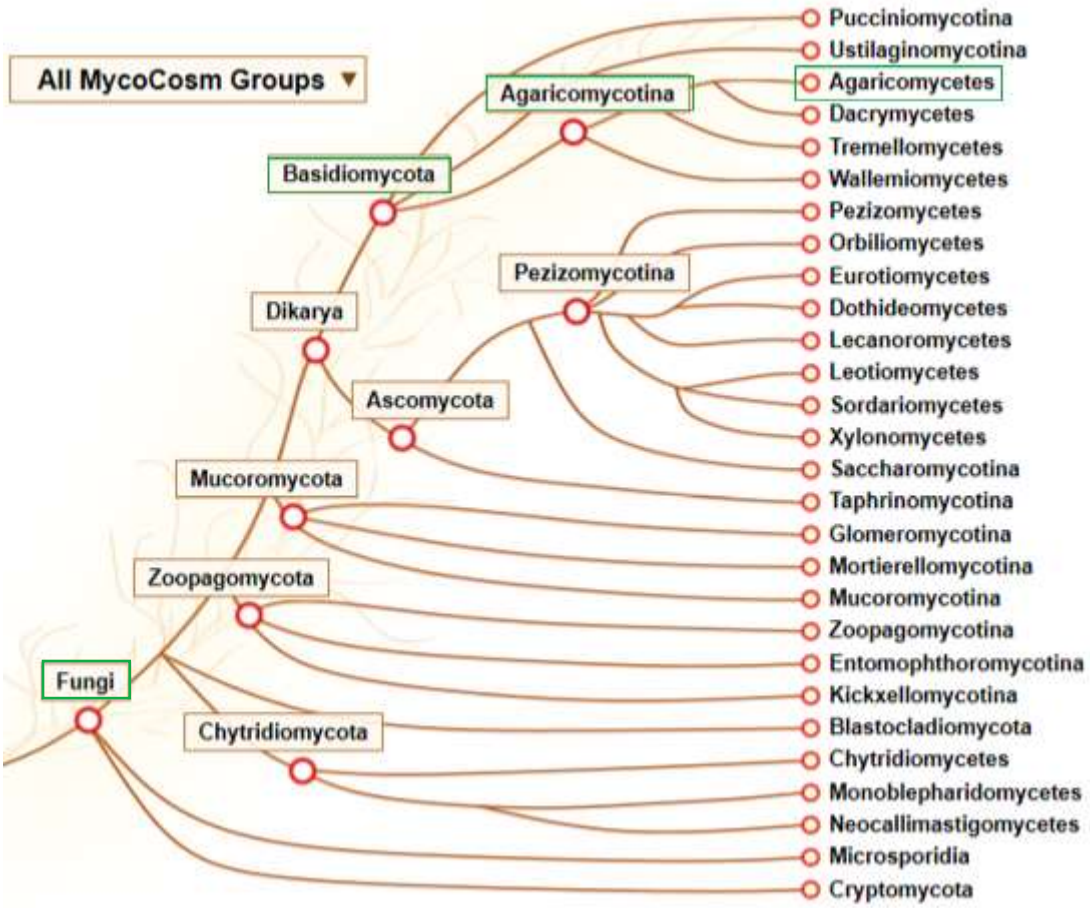

***Figura 6**. Árbol filogenético del reino de los hongos (JGI mycocosm)*

En cuanto a la taxonomía, en la *Figura 6* se encuentran rodeados de color verde se encuentra los taxones de los cuales forma parte *P. chrysosporium* dentro del árbol filogenético. *Agaricomycetes* es una clase de hongos que incluye 17 órdenes, 100 familias, 1147 géneros y 20951 especies, entre las cuales se encuentra *P. chrysosporium* (Ohm et al. 2014). La clasificación taxonómica completa se encuentra en la *Tabla 2*.

***Tabla 2**. Clasificación taxonómica de P. chrysosporium (Floudas et al. 2015)*

Clasificación taxonómica	
Reino	*Fungi*
Filo	*Basidiomycota*
Clase	*Agaricomycetes*
Orden	*Polyporales*
Familia	*Phanerochaetaceae*
Genero	*Phanerochaete*
Especie	*Phanerochaete chrysosporium*

Este hongo se ha relacionado con el tratamiento de residuos difícilmente biodegradables porque además de poseer un sistema degradador de la lignina, es de rápido crecimiento y su cultivo es de fácil manejo. Sus buenas propiedades lignocelulósicas se deben a que secreta enzimas extracelulares. Estas enzimas son homoperoxidasas glicosiladas, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), y un sistema generador de H_2O_2 (Rodríguez et al., 1998).

P. chrysosporium tiene ciertas características que lo hacen extremadamente útil, mantiene la celulosa intacta y tiene una temperatura de trabajo optima de aproximadamente 40ºC, por lo que puede crecer en chips de madera o materiales compostables, que alcanzan una elevada temperatura durante el proceso de tratamiento. Estas características permiten múltiples y diferentes aplicaciones biotecnológicas del hongo (Ohm et al. 2014). Dentro de estas aplicaciones podemos encontrar la delignificación parcial de la madera como pretratamiento para la obtención de pasta de celulosa (Pellinen et al. 1989), la conversión de productos lignocelulósicos en pienso, mejorando su digestibilidad en rumiantes (Basu et al. 2002), o el tratamiento de residuos difícilmente biodegradables, entre otros.

Posee filamentos, conocidos como hifas, que podemos apreciar en la *Figura 7*. Además, posee esporas, encargadas de la reproducción cuya característica principal es la posibilidad de resistir condiciones ambientales adversas.

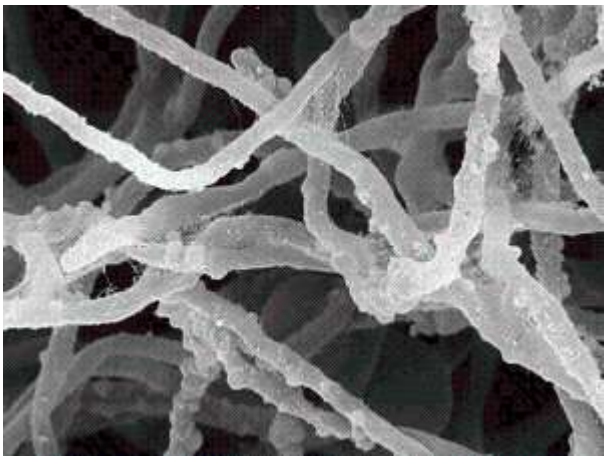

***Figura** 7. Hongo Phanerochaete chrysosporium. (Ohm et al. 2014)*

2.3.2. Enzimas producidas por el hongo *P. chrysosporium*

Se trata de una serie de oxidasas y peroxidasas no específicas que generan radicales libres de lignina, los cuales desencadenan reacciones espontaneas de rotura de este polisacárido recalcitrante. La naturaleza no especifica y su excepcional poder de oxidación hacen de este microrganismo una aplicación muy interesante en la degradación de compuestos contaminantes y de fibra (Rodríguez et al., 1998). Por ello, degrada lignina y un gran rango de compuestos aromáticos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los clorofenoles, por lo que es un candidato ideal para la eliminación de compuestos recalcitrantes y xenobióticos (Aloui, 2007).

Las enzimas extracelulares más abundantes y características son la enzima lignina peroxidasa y la enzima manganeso peroxidasa.

2.3.2.1. Lignina peroxidasa (LiP)

Esta enzima está involucrada en la rotura del enlace C_α-C_β de la lignina mediante la oxidación del hierro hemo gracias al peróxido de hidrogeno. El H_2O_2 oxida al grupo hemo presente en la enzima, el cual oxida a dos compuestos intermedios de la reacción, lo que conlleva la final oxidación de compuestos recalcitrantes, como es el caso del alcohol veratrílico (Hammel et al. 2008).

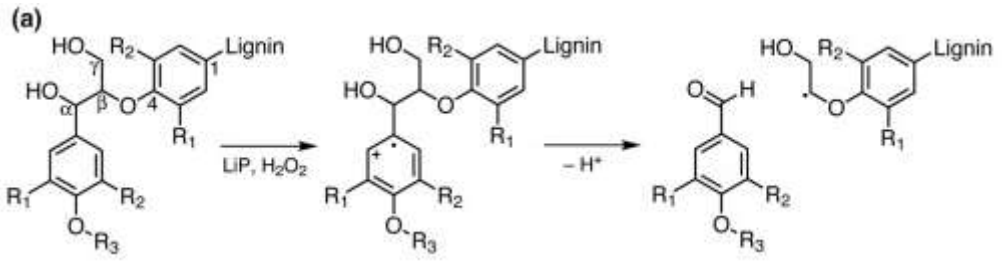

Figura 8. *Rotura del enlace C_α-C_β de la lignina por parte de la LiP (Hammel et al, 2008).*

Esta peroxidasa oxida el alcohol veratrílico a veratraldehido, como se esquematiza en la *Figura 8*. Principalmente, LiP oxida sustratos aromáticos.

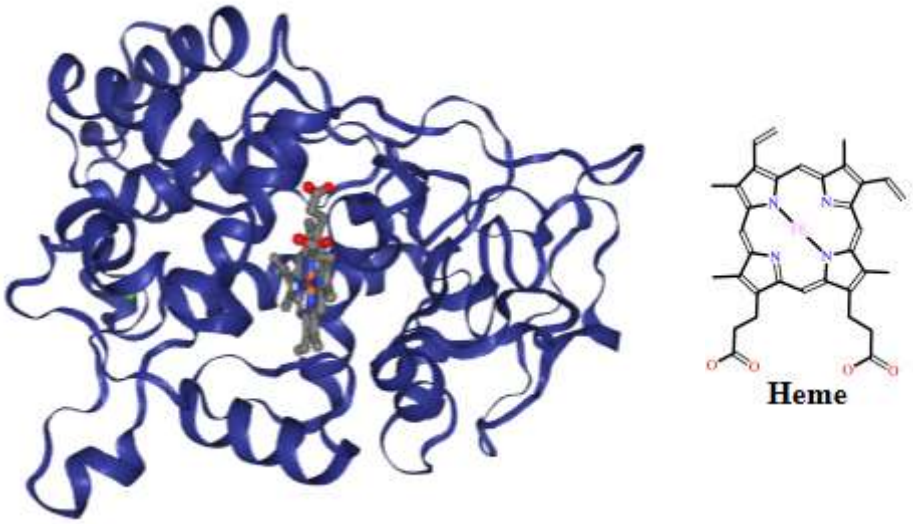

Figura 9. *Estructura tridimensional de LiP obtenida mediante el PDB (Protein Data Bank) ID:1B80 y estructura del grupo hemo*

La *Figura 9* es una imagen tridimensional que representa la estructura proteica de la enzima, visualizándose una única cadena en color azul, con hélices alfa como estructuras secundarias. En el centro de la misma está representado el grupo hemo, el cofactor de la enzima, representado con los carbonos de color gris y los oxígenos en rojo. A la derecha se representa la estructura del grupo hemo.

2.3.2.2. Manganeso peroxidasa (MnP)

Esta enzima oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} utilizando peróxido de hidrogeno como oxidante. El Mn^{3+} es liberado del sitio activo de la enzima en presencia de un quelante (grupo hemo), que estabiliza este ion impidiendo la formación de Mn^{2+} o del ion insoluble Mn^{4+}. Es entonces cuando el complejo Hemo-Mn^{3+} difunde hasta la pared lignocelulósica, donde

oxida componentes fenólicos de la lignina y otros sustratos recalcitrantes (Cullen et al. 2004).

$$2\ Mn^{+2} + H_2O_2 + 2\ H^+ \rightleftharpoons 2\ Mn^{+3} + 2\ H_2O$$

***Figura 10**. Reacción química catalizada por la enzima MnP.*

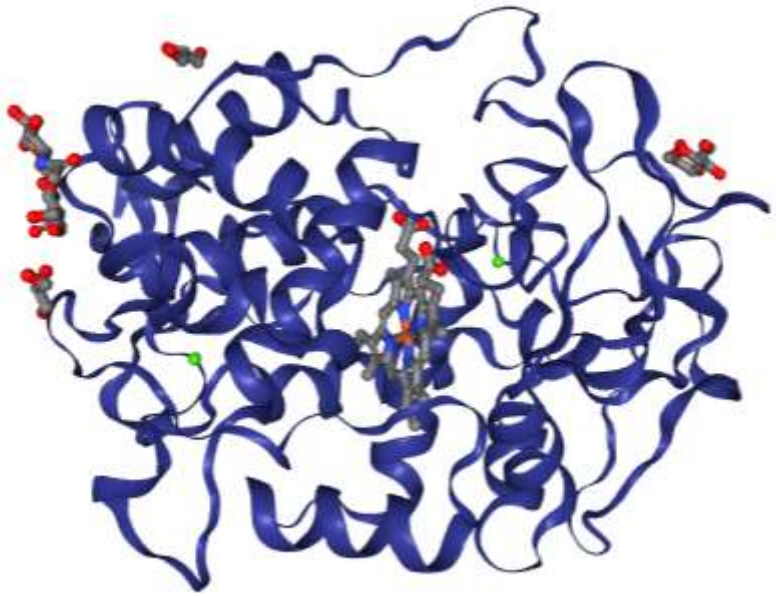

***Figura 11.** Estructura tridimensión de MnP obtenida mediante el PDB (Protein Data Bank) ID: 1mn1*

En este caso se distingue el grupo hemo en el centro de la estructura tridimensional proteica. Al igual que la LiP, también posee una única cadena, con hélices alfa como estructura secundaria predominante. Además del grupo hemo, la enzima posee otros ligandos, como N-Acetil Glucosamina, el ion calcio, glicerol o alfa-D-Manosa. Todos los ligandos son representados con los carbonos de color gris y los oxígenos en rojo.

Como se puede observar, la estructura cristalina de la enzima manganeso peroxidasa muestra similitudes con la lignina peroxidasa.

P. chrysosporium produce además otras enzimas destacables, como la glioxal oxidasa (GLOX). Esta enzima degrada metabolitos lignocelulósicos obtenidos tras la degradación parcial de la lignina peroxidasa (Cullen et al. 2004).

2.3.3. Ejemplos de aplicación de *P. chrysosporium* en el tratamiento de residuos

Como *Phanerochaete chrysosporium* posee enzimas delignificantes, una de las aplicaciones de *P. chrysosporium* es producir piensos animales a partir de residuos

vegetales con alto contenido en lignina, como puede ser paja de trigo. Para ello es necesario conseguir una elevada degradación de la lignina por parte del hongo, y un mínimo uso de la celulosa, destinada a los animales como alimento (Basu et al. 2002).
Se ha estudiado la aplicación de este hongo a paja de arroz, un material lignocelulósico recalcitrante. Para aumentar la degradación se ha realizado un pretratamiento Fenton junto con la adición de *P. chrysosporium* y *Asperigillus niger*, lo que muestra una degradación del 15% de la lignina. Esto puede resultar una posible aplicación en cuanto a la obtención de energía a partir de lignocelulosa (Chen et al. 2018).

También se ha aplicado para tratar efluentes con pigmentos textiles sintéticos. Un ejemplo de ellos es el pigmento azoico, ampliamente utilizando en la industria textil y difícilmente degradable debido a su estructura compleja. Como no se fija completamente a las telas, durante el procedimiento de tinción se obtienen aguas residuales con grandes cantidades del pigmento, causando un gran problema medioambiental. Sin embargo, la estructura de los pigmentos azoicos es muy similar a la de la lignina, por lo que estos compuestos pueden ser degradados utilizando *P. chrysosporium*, permitiendo la decoloración de estos efluentes (Senthilkumar et al. 2014). Además de estos colorantes textiles, también se puede aplicar a la degradación de otros colorantes orgánicos sintéticos presentes en cosméticos, industria papelera e industria farmacéutica (Mielgo et al. 2002).

Otra aplicación es cultivar estos hongos junto con residuos industriales para que produzcan las enzimas ligninolíticas para así poderlas aplicar directamente a compuestos recalcitrantes. Esto se realiza mediante la fermentación en estado sólido del hongo en diferentes medios de cultivo. Como medio de cultivo se han encontrado buenos resultados utilizando diferentes residuos agroindustriales, como pueden ser residuos de la industria cervecera, residuos de la industria pesquera, residuos de la industria papelera y residuos de manzanas (Gassara et al. 2010).

Por otro lado, aunque la aplicación de aguas residuales a suelos agrícolas representa una solución a la elevada cantidad de residuos generados y además aumenta la fertilidad del suelo, también presenta ciertos inconvenientes. Los solidos presentes en estas aguas residuales pueden poseer contaminantes, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs), los cuales son degradados gracias a la adición de *P. chrysosporium* a estos residuos (Taha et al. 2018). Estos PHAs, como el antraceno, también están presentes en otros residuos industriales. Un ejemplo de ellos es el bagazo, residuo de la industria azucarera. La enzima manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium* degrada este

hidrocarburo aromático policíclico, permitiendo que el bagazo pueda ser utilizado como fuente de combustible industrial (Mohammadi et al. 2009).

Entre otros de los muchos compuestos contaminantes que *P. chrysosporium* puede degradar, se encuentra el grafeno. Se trata de un material con un gran potencial en análisis, medicina, electrónica, energía, agricultura y remediación medioambiental. Sin embargo, su residuo es un producto peligroso, por lo que su transformación es fundamental. Gracias a la actividad enzimática del hongo, se oxida el óxido de grafeno reducido (RGO), lo que debilita sus láminas. Sin embargo, la rotura completa de las mismas se obtiene con mayor eficiencia adicionando lignina peroxidasa al grafeno, la enzima asilada de este hongo. De esta manera, también podría investigarse la adición de *P. chrysosporium* a otros materiales 2D (Yang et al. 2019).

Otros contaminantes que pueden estar presentes son los metales pesados, y *P. chrysosporium* estabiliza y degrada los metales pesados presentes en las muestras. Se ha comprobado que, además, acelera el proceso de compostaje y el grado de humificación del propio compost. Además, es beneficioso para la pasivación de metales pesados como el cadmio, plomo y cobre ya que quela el humus orgánico (Chen et al. 2019). Posee tolerancias y puede realizar biotransformación de residuos altamente contaminantes, con elevado contenido de cadmio (Guo et al. 2018).

Aunque la evidencia de que *P. chrysosporium* acumule metales pesados como el cadmio y el plomo puede resultar interesante en el tratamiento de muestras con dichos metales, es importante considerar que estos metales pesados tienen una influencia negativa en la producción de enzimas lignocelulósicas. Su acumulación afecta tanto al crecimiento del propio hongo como a su actividad metabólica (Zhao et al. 2016).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestra del residuo aceitero y pretratamiento

El residuo aceitero empleado en este proyecto ha sido proporcionado por la empresa ACESUR. Esta empresa posee una almazara para la recepción de las aceitunas y extracción del aceite por centrifugado. De estas almazaras se obtiene el alpeorujo, del cual se elimina el agua en un secadero. Del residuo resultante se extrae el aceite de orujo empleando un disolvente orgánico como agente extractante (http://acesur.com/).
El alpeorujo recibido posee la consistencia de la *Figura 12*. Este alpeorujo se mantuvo refrigerado en nevera durante 3 meses antes de ser utilizado.

Figura 12. *Alpeorujo bruto*

Como posee un alto contenido en sólidos, se mezcló con agua destilada, con ayuda de una batidora, en una dilución 1:20 antes de realizar los tratamientos (*Figura 13*).

Figura 13. *Dilución 1:20*

El residuo diluido contiene sólidos insolubles, algunos de gran tamaño, procedentes de restos de la piel y el hueso de las aceitunas. Estos se separaron mediante un tamiz de 1,5 mm de tamaño de reja, como se muestra en la *Figura 14*.

Figura 14. *Sólidos obtenidos tras el tamizado*

Posteriormente, los sólidos insolubles de menor tamaño se separaron mediante dos centrifugaciones de 10 minutos cada una, a 9000g, y una posterior filtración por quitasatos, con un filtro de celulosa de tamaño de poro de 10-20 micrómetros (*Figura 15*).

Figura 15. *A) Centrífuga utilizada para el pretratamiento*
B) Filtración por quitasatos o por bomba de vacío

Estos dos tratamientos eliminan una gran cantidad de sólidos insolubles, ya que se ve una notable reducción del color después de los mismos, tal y como se indica en la *Figura 16*.

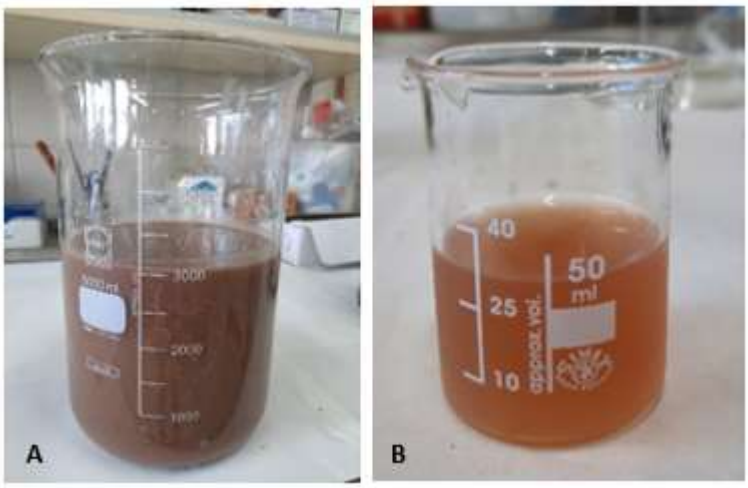

Figura 16. *A) Alpeorujo tamizado sin centrifugar ni filtrar B) Alpeorujo tamizado, centrifugado y filtrado*

El alpeorujo diluido 1:20, tamizado, centrifugado y filtrado es lo que se tomó como muestra inicial para el tratamiento con hongos. Las características físico-químicas de esta muestra inicial se recogen en la *Tabla 3*.

Tabla 3*. Caracterización físico-química de la muestra inicial utilizada en los ensayos de biodegradación.*

Parámetro	Valor [mg/l]
pH	4,6
DQO	4854
DBO_5	408
Biodegradabilidad	0,08
Azúcares reductores	578
Fenoles totales	134
IC	1,6
SST	2475
SSF	375
SSV	2100

3.2. Microrganismo y obtención del inoculo

Para la realización de este trabajo se empleó el hongo *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall 1974, en concreto la cepa CECT 2798. El hongo se adquirió liofilizado y se conservó a 4ºC en nevera hasta su recuperación. El proceso de recuperación del hongo liofilizado, así como la obtención de pellets empleados en los ensayos de biodegradabilidad, se describen a continuación. Este trabajo se realizó en la campana de flujo laminar con el objetivo de trabajar en condiciones asépticas (*Figura 17*).

Figura 17. *Campana de flujo laminar empleada para el crecimiento del hongo y el ensayo*

Se ha empleado el hongo *P. chrysosporium* ya que muestra mayores eficacias de degradación de DQO, color y fenoles en residuos de alpeorujo en comparación con otras especies fúngicas como *Trametes versicolor, Pycnoporus cinnabarinus* o *Aspergillus niger* (Aloui et al. 2007).

1. <u>Recuperación del cultivo liofilizado</u>

En primer lugar, se calentó la ampolla de 5 a 15 segundos con una llama, evitando que el calor incidiera directamente en las zonas donde están las células fúngicas para evitar su daño. A continuación, se añadió agua estéril gota a gota, lo que provocó el resquebrajado del vidrio. Los fragmentos de vidrio de la ampolla rotos se retiraron con unas pinzas esterilizadas. A continuación, se añadieron 0,3 ml de medio estéril de extracto de malta (ME) y se resuspendió el liófilo, evitando la formación de burbujas de aire. Para la hidratación completa del mismo, se dejó reposar 30 minutos. Se inocularon 100 µl de la suspensión obtenida en un tubo con 10 ml de medio ME. El resto de muestra se empleó

para sembrar placas Petri con 25 ml de extracto de malta con agar 1,5% (p/v). Las placas se incubaron durante una semana a 26ºC.

2. Obtención del micelio

Se añadió 150 ml de medio ME en un matraz de 500 ml, y se ajustó el pH entre 4,5 y 5,5 mediante disoluciones NaOH 0,5 M y HCl 0,5 M. Los matraces así preparados se esterilizaron en autoclave a 121ºC durante 30 minutos. De la región más externa de la placa de Petri, correspondiente a la zona de crecimiento activo del hongo, se extrajeron mediante un sacabocados 5 cilindros de 1 cm de diámetro, y se añadieron al matraz. El matraz se incubó a 26ºC y 135 rpm durante 6-7 días. A continuación, mediante un colador esterilizado se recuperó el microrganismo, se resuspendió en una disolución de NaCl al 0,8%, en una relación 1:3 (p/v). De esta manera se obtuvo una suspensión micelial que se conservó a 4ºC en nevera.

3. Formación de pellets de *P. chrysosporium*

En primer lugar, se preparó un matraz de un litro con 250 ml de medio ME, se ajustó el pH entre 4,5 - 5,5, y se esterilizó durante 20 minutos a 121ºC. Cuando el medio estuvo frío se inoculó con 600 µl de la suspensión micelial obtenida en el paso anterior. Los matraces inoculados se incubaron a 26ºC y 135 rpm durante 6 días. Pasado este tiempo se recuperaron los pellets de hongo formados mediante un colador y se realizó el trasvase de los hongos a una solución estéril de NaCl al 0,8% (p/v). Esta solución salina conteniendo los pellets se conservó en nevera a 4ºC.

Figura 18. *Conservación de los pellets de P. chrysosporium en la disolución NaCl 0,8%, en nevera a 4ºC.*

3.3. Ensayos de tratamiento con hongos

Con la muestra de alpeorujo diluida, centrifugada y filtrada, tal y como se describe en el apartado 3.1. se han realizado los siguientes experimentos, todos ellos por duplicado:

- Control 1 (C1): alpeorujo diluido
- Control 2 (C2): alpeorujo diluido suplementado con fuente de carbono
- Experimento 1 (E1): alpeorujo diluido inoculando hongo
- Experimento 2 (E2): alpeorujo diluido suplementado con fuente de carbono inoculando hongo

La fuente de carbono adicional corresponde a 3g/L de glucosa. La cantidad de hongo añadido en el ensayo es 3g/L en peso seco. Se han elegido estas cantidades por haber resultado adecuadas en experimento previos realizados con *P. chrysosporium* y licor procedente de un proceso de biometanización.

Para la realización de cada ensayo, se añadieron 250 ml de la muestra inicial de alpeorujo a un matraz Erlenmeyer de 1 litro, en los cuales se va a realizar el experimento. El volumen escogido es el ideal para mantener una buena relación aire/volumen y asegurar la disponibilidad de oxígeno en el tratamiento. Como el ensayo se realiza por duplicado, se prepararon 8 matraces en total.

Una vez añadidos los 250 ml de muestra inicial a cada matraz, se añaden 3 g/L de glucosa en los matraces C2 y E2. Los pellets de hongo conservados en nevera se recogen con ayuda de un colador para poder pesarlo y adicionarlo a los matraces E1 y E2.

Figura 19. *Recogida de los pellets de P. chrysosporium de la disolución de NaCl al 0,8% para ser pesado y adicionar la cantidad exacta a cada matraz.*

El hongo que ha crecido en forma de pellets posee una humedad aproximada del 97%. Teniendo este dato en cuenta, se añadió a cada matraz la cantidad de hongo en peso húmedo que proporciona una concentración aproximada de a 3 g/L en peso seco.

Figura 20. *Incubador orbital en el que se realiza el crecimiento de P. chrysosporium y el ensayo de la muestra con el hongo. Mantiene las condiciones a 26ºC y una agitación de 135 rpm.*

Durante el ensayo se mantuvo el pH entre el rango 5-6 para garantizar la efectividad del hongo. Para ello, todos los días antes de la toma de muestra se medía el pH y se ajustaba mediante la adición de NaOH 0,5 M y HCl 0,5 M, como puede verse en la *Figura 21*.

Figura 21*. Medición y ajuste de pH durante el ensayo*

3.4. Toma de muestra

Se tomaron muestras a distintos tiempos (diariamente excepto fin de semana) de los 4 ensayos (8 matraces ya que se prepararon por duplicado). El volumen de muestra retirado era de 6 ml, excepto los días 4 y 10 donde fue necesario coger un volumen de 30 ml para la determinación de la DBO_5. El procesado de las muestras se realizaba inmediatamente después de la toma. Todas las muestras se centrifugaban a 15000 g durante 15 minutos, a 18 grados de temperatura. El sobrenadante se traspasaba a tubos estériles que se mantenían congelados hasta el momento del análisis.

***Figura 22**. Centrifuga utilizada tras la toma de muestra*

3.5. Métodos analíticos

3.4.1. Medida del pH

El pH se midió todos los días mediante un pH-metro Basic-20 de la marca Dilabo. Se corrigió todos los días con disoluciones 0,5 M NaOH y 0,5 M HCl a 5,8-6,1, exceptuando el día 4 en el cual el pH se corrige en el intervalo 5,0-5,20 para evitar una subida excesiva del mismo durante el fin de semana en el que no se corrige el pH.

3.4.2. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno permite conocer el contenido en materia orgánica total de una muestra liquida. Con el método utilizado, se produce la oxidación de la materia orgánica debido a la presencia de un oxidante químico fuerte, el dicromato potásico, $K_2Cr_2O_7$. En esta reacción redox, el Cr (VI) se reduce a Cr (III), el cual muestra una coloración verdosa, de tal manera que la cantidad de Cr (III) formada es proporcional a la materia orgánica presente inicialmente en la muestra, y se puede determinar por espectrofotometría.

Para realizar el análisis se emplearon dos soluciones: la solución A y la solución B. La solución A se prepara a partir de sulfato de plata diluido con ácido sulfúrico al 96%, en una concentración de 6,6 g/L. La disolución B se realiza disolviendo 4 g de sulfato de plata en 35 ml de la disolución A, a los que se añaden 100 ml de dicromato potásico 0,25 N.

Para realizar el calibrado de este análisis se empleó como patrón ftalato de potasio. Partiendo de una disolución de 0,85 g/L, se realizaron diluciones con el fin de obtener distintas concentraciones. En cada tubo de digestión se echó un volumen de 3 ml de patrón, al cual se le añadieron 4 ml de la disolución A y 2 ml de la B. Los tubos así preparados se agitaron y se introdujeron en el digestor a 150ºC durante 2 horas. A continuación, se dejaron enfriar durante media hora y se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (*Figura 23*).

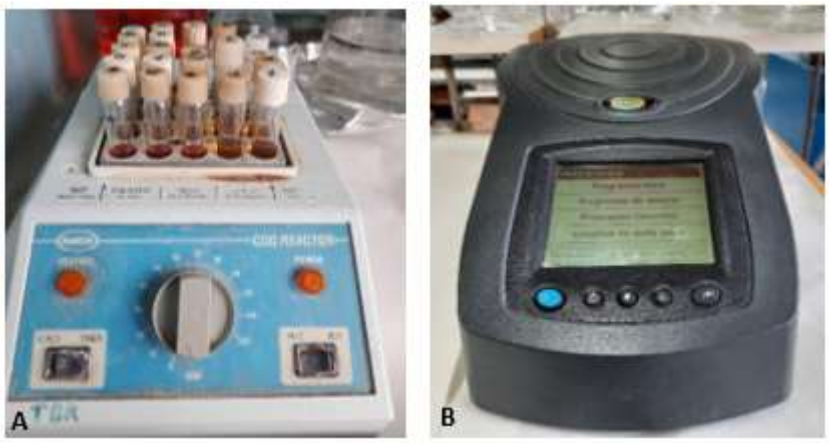

***Figura 23**. A) Digestor empleado; B) Espectrofotómetro en el que se ha acoplado un sistema que permite la medición de la absorbancia de la muestra directamente desde un tubo de vidrio.*

Con los datos obtenidos, se realizó una representación gráfica y se obtuvo la recta de calibrado y la ecuación de la recta, representada en la *Figura 24*. A partir de esta ecuación se pudo determinar la concentración DQO presente en las muestras analizadas.

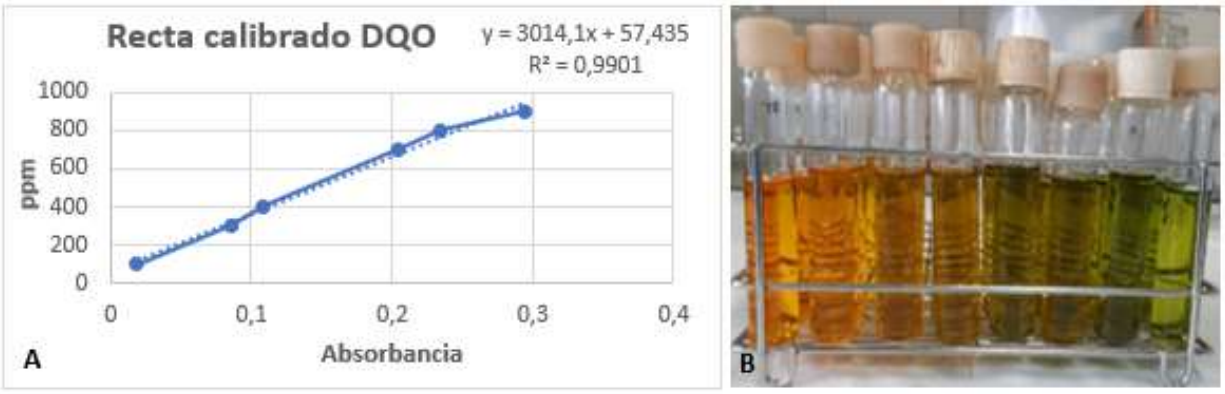

***Figura 24**. A) Representación gráfica de las absorbancias de las muestras del calibrado frente a su concentración, indicando la ecuación y R^2 de la recta. B) Disoluciones patrón obtenidas.*

A continuación, se prepararon las muestras de la misma manera que el patrón. Cuando fue necesario, se realizaron diluciones de la muestra con el fin de que la absorbancia que se obtuviera dentro del rango de la recta patrón Este ensayo se realizó por triplicado.

3.4.3. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5)

La demanda bioquímica de oxígeno permite medir el contenido en materia orgánica biodegradable presente en una muestra líquida. El fundamento de este método es la medición del oxígeno consumido por los microorganismos utilizado para degradar la

materia orgánica presente. El tiempo necesario para una oxidación completa es de 21 a 28 días, sin embargo, lo habitual es medirlo a los 5 días obteniéndose la DBO_5.

Para medir la DBO_5 se utilizaron respirómetros manométricos (método de Warburg), que relacionan el cambio de presión en el espacio de cabezas con el consumo de oxígeno. Para realizar este método se ajustó el pH de las muestras entre 6,5 y 7 mediante disoluciones NaOH 0,5 M y HCl 0,5 M. Para realizar el ensayo, se añadieron 56 ml de muestra en cada botella de DBO_5 y se introdujo un imán de agitación en cada una. No fue necesario diluir las muestras.

No se adicionó inóculo ya que la propia muestra poseía microrganismos. A continuación, se añadieron unas gotas de inhibidor de la nitrificación, cuya función es evitar la oxidación de nitritos y sales amoniacales susceptibles de la misma. Se colocaron las boquillas en cada botella y en esta se añadieron 4 gotas de hidróxido potásico para "fijar" el CO_2. Se enroscaron los cabezales en las botellas sin apretar y se dejaron 30 minutos en el incubador a 20ºC para que la muestra se estabilice a esa temperatura. Pasado ese tiempo, se cerraron los cabezales, se colocaron sobre un agitador y se activó el comienzo de la medida estableciendo este momento como tiempo cero. En cada tanda de medidas se preparó un blanco formado por agua de dilución. Cada muestra se analizó por duplicado.

Figura 25. *Equipos de medida para el análisis de DBO_5 de las muestras, en el interior de un incubador que mantiene la temperatura a 20ºC.*

3.4.4. Biodegradabilidad

La biodegradabilidad indica la cantidad de materia orgánica biodegradable con respecto a la materia orgánica total presente en una muestra. El parámetro "biodegradabilidad" fue calculado mediante el cociente DBO_5/DQO.

3.4.5. Determinación de carbohidratos reductores

La determinación de carbohidratos reductores se realizó mediante el método del DNS, que identifica la presencia de los grupos carbonilos libres de los azúcares mediante una reacción redox. El ácido 3,5-dinitrosalicílico (color amarillo) provoca la oxidación de los azucares, mientras se reduce formando ácido 3-amino-5-salicílico (color pardo). Esta oxidación es proporcional a la cantidad de azucares reductores y se puede determinar mediante espectrofotometría (Miller, 1959).

Se realizó un calibrado a partir de una disolución de glucosa de 1000 mg/l. Fue necesario preparar el reactivo DNS tal y como se indica en la *Tabla 4*. Se trata de un reactivo fotosensible por lo que es importante cubrirlo con papel de aluminio para evitar su contacto con la luz.

Tabla 4. *Preparación del reactivo DNS*

Reactivo DNS	Cantidad
NaOH	0,8 g
Tartrato de Na y K rehidratado	15 g
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	0,5 g
Agua destilada	50 ml

Como paso previo al análisis de las muestras, se realizaron diluciones 1:25, 1:10 y 1:2, dependiendo de la muestra, para que la señal de absorbancia obtenida entre en el calibrado realizado. A continuación, se añadieron 500 µl de muestra diluida y 500 µl de reactivo DNS en un tubo de ensayo, y se calentaron durante 5 minutos en un baño de agua caliente a 95ºC. Se realizó un blanco sustituyendo la muestra por agua destilada. La reacción se paró introduciendo durante otros 5 minutos los tubos en hielo. A continuación, se añadió a cada tubo 5 ml de agua destilada, se agitaron bien y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm. Este ensayo también se realizó por triplicado.

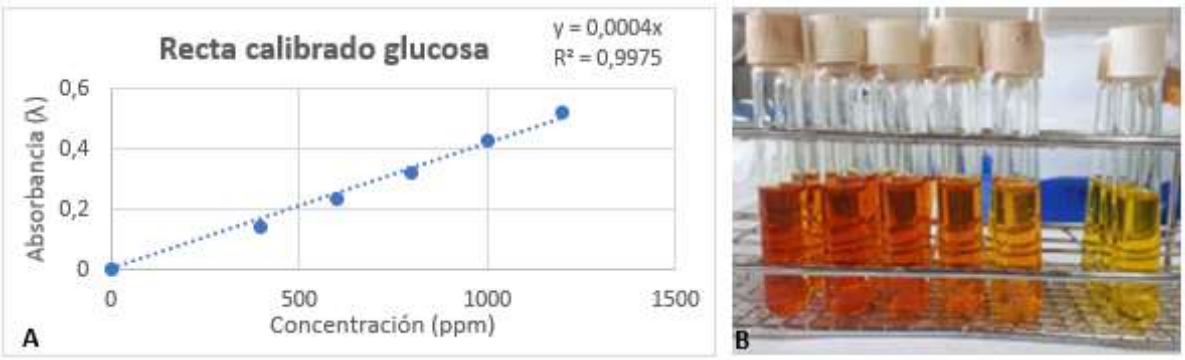

Figura 26. *A) Representación gráfica de las absorbancias de las muestras del calibrado frente a su concentración, indicando la ecuación y R^2 de la recta. B) Disoluciones patrón realizadas.*

3.4.6. Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales fueron determinados a través del método de Folin-Ciocalteau, realizando un calibrado con ácido gálico y empleando agua destilada para el blanco.

Para la realización del análisis se añadieron a tubos de vidrio 400 µl de muestra adecuadamente diluida (o patrón). A continuación, se adicionó 3 ml de reactivo de Folin diluido 1:10, y se incubó durante 5 minutos en un baño a 22ºC. A continuación, se añadieron 3 ml de una disolución de $NaHCO_3$ (6 g/100 ml), y se incubó en el baño a 22ºC, durante 90 minutos. Por último, se midió la absorbancia a 725 nm.

Figura 27*. Baño utilizado, el cual se mantenía a 22ºC.*

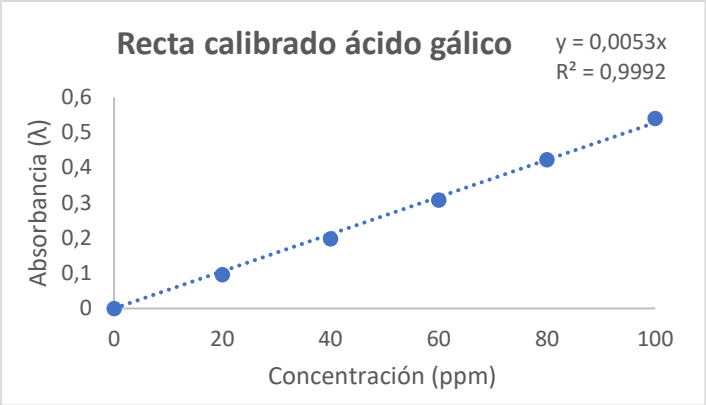

***Figura 28**. Recta de calibrado realizada con un patrón de ácido gálico.*

Todos los pasos fueron realizados en oscuridad, tapando los tubos con papel de aluminio, para evitar la posible degradación de los fenoles. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.4.7. Determinación del índice colorimétrico

El color lo aportan los compuestos presentes en la muestra, por lo que es interesante analizarlo a lo largo de los tratamientos para valorar la evolución del residuo. Para ello, se mide la absorbancia de las muestras a tres longitudes de onda: 436, 525 y 620 nm, y se aplica la siguiente ecuación:

$$\mathbf{IC} = \frac{\mathbf{SAC}_{436}^{2} + \mathbf{SAC}_{525}^{2} + \mathbf{SAC}_{620}^{2}}{\mathbf{SAC}_{436} + \mathbf{SAC}_{525} + \mathbf{SAC}_{620}}$$

En esta ecuación los SAC (Spectral Absorption Coefficient) son los coeficientes de absorbancia espectrales obtenidos del cociente del valor de la absorbancia a una longitud de onda entre el espesor de la celda o cubeta. Como normalmente el espesor de la cubeta es 1 cm, el valor del SAC es idéntico al de la Absorbancia. Como blanco para la medida de la absorbancia se utilizó agua destilada. El equipo utilizado es el espectrofotómetro que se muestra en la *Figura 29*.

Figura 29. *Espectrofotómetro utilizado para la determinación del índice colorimétrico.*

3.4.8. Determinación del contenido en humedad, sólidos totales (SST), volátiles (SSV) y fijos (SSF)

Para determinar la humedad y los sólidos totales se añadió un volumen determinado de muestra en una cápsula de porcelana previamente pesada. Se pesó el volumen de muestra añadido y se introdujo un día en la estufa a 105ºC. A continuación, se sacó, se dejó enfriar en un desecador y se pesó de nuevo. El peso resultante, al restar el de la cápsula, son los sólidos totales y el peso evaporado, la humedad.

Las cenizas o sólidos fijos se determinaron al someter la muestra obtenida de la estufa a 550ºC en la mufla durante un día. Posteriormente, se dejaron las muestras en el desecador hasta que alcanzaron temperatura ambiente y se pesaron de nuevo. Los sólidos volátiles se calcularon por diferencia.

Figura 30*. Estufa utilizada para realizar peso seco de la muestra*

4. RESULTADOS

4.1. Evolución del pH

Como se ha comentado en el apartado 3.3., el pH ha sido controlado de manera manual mediante la adición de NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M, con el fin de mantenerlo en la medida de lo posible dentro del intervalo de valores optimo para *P. chrysosporium*, 4-6.

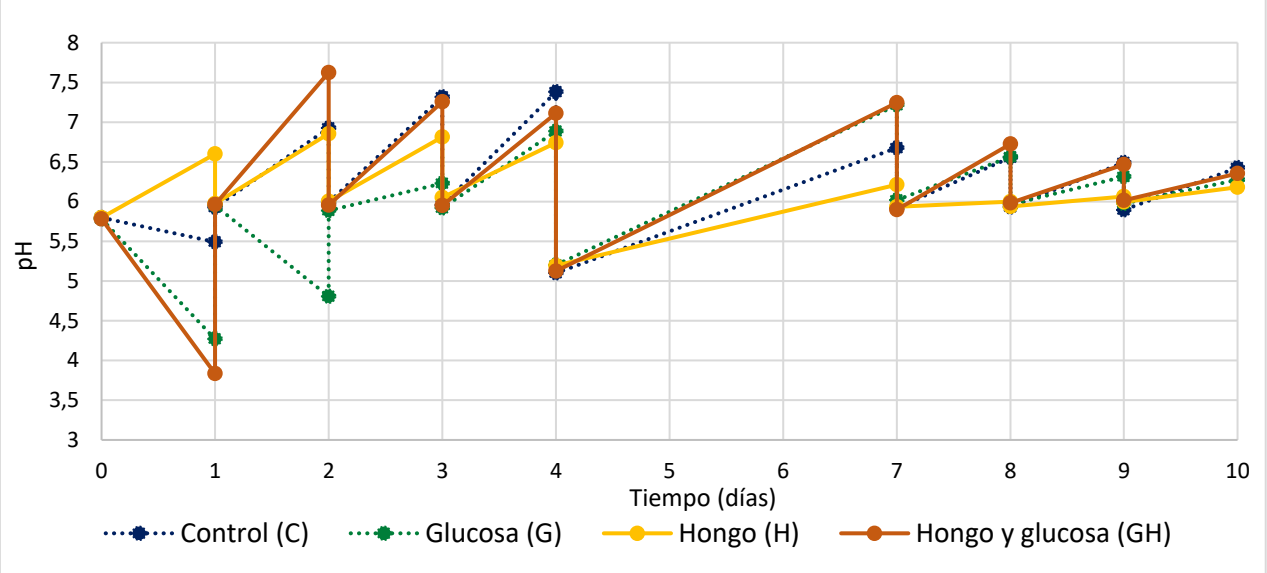

Figura 31. *Evolución del pH a lo largo de los tratamientos. Se muestran las medias de los duplicados. En todos los casos se obtuvo una desviación estándar inferior al 4% del valor.*

En la *Figura 31* se muestran los valores de pH que han sido corregidos todos los días del tratamiento, exceptuando los días 5 y 6 que coincidieron en fin de semana. El pH del alpeorujo diluido (muestra inicial) era de 4,6 y se ajustó en todos los casos a un valor de 5.8 antes de comenzar los ensayos. Posteriormente, el valor del pH fue controlado ajustándolo entre 5,8-6 con el fin de mantenerlo dentro del intervalo óptimo de actividad del hongo, el cual está entre 4-6 (Hailei et al. 2016).

El primer día del tratamiento se observó, en los casos en los que se había adicionado glucosa, una bajada del pH hasta valores próximos a 4, lo cual parece deberse al consumo de este azúcar por parte de los microorganismos presentes en la muestra que diera lugar a la liberación de CO_2 y ácidos orgánicos. A partir del segundo día, las muestras presentaron un aumento del pH, alcanzándose durante los primeros días valores próximos a 7 en todos los casos. El día 4, el pH se ajusta a 5,1 en vez de 5,8-6, para evitar un elevado aumento del mismo durante los dos días en los que no fue posible realizar el control de pH. Se puede observar en la *Figura 31* cómo el sistema de control empleado resultó

efectivo y la mayor parte del tiempo los valores de pH estuvieron dentro del intervalo considerado óptimo para la actividad del hongo. En los últimos días del tratamiento se muestra como el pH medido cada vez varía menos con respecto al corregido, debido a la reducción de la actividad microbiana.

4.2. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno es un parámetro importante a valorar durante el ensayo ya que muestra tanto la cantidad de materia orgánica biodegradable como aquella más recalcitrante, no asimilable por la mayoría de los microrganismos.

Como ya se ha comentado, la DQO de la muestra inicial era de 4854 mg/L, mientras que la DQO de las muestras suplementadas con glucosa al inicio del tratamiento era de 9243 mg/L.

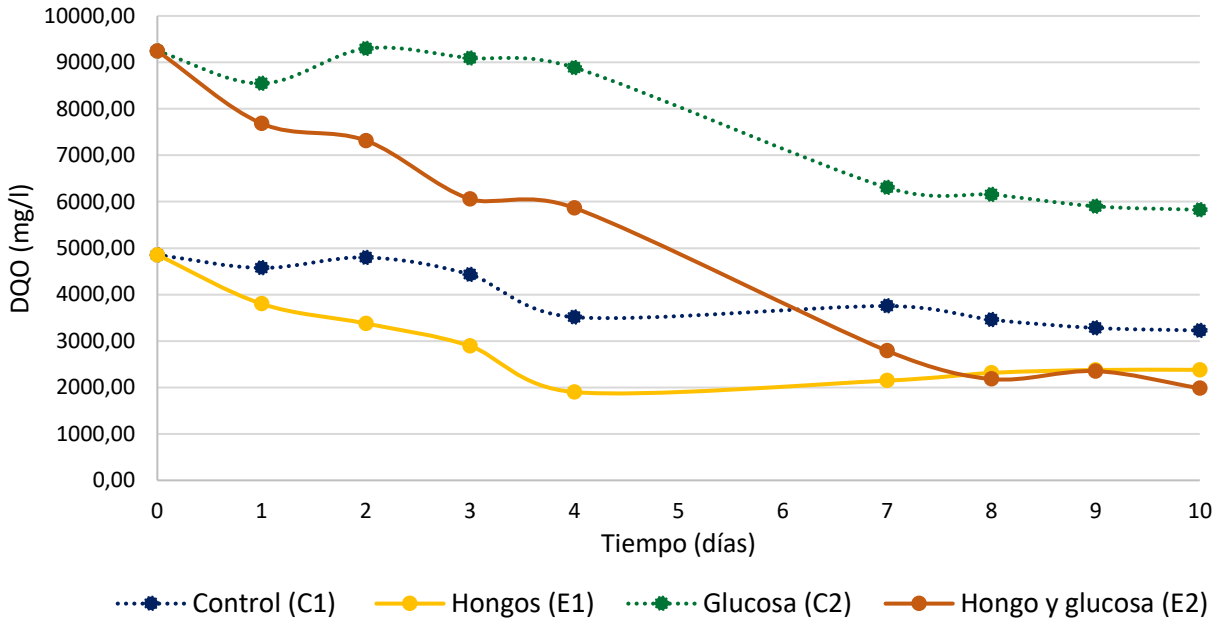

Figura 32. *Evolución de la demanda química de oxígeno durante el tratamiento. Se muestran los valores medios de los duplicados. Todos los valores de desviación estándar son inferiores al 6,5% del valor.*

Como se puede ver en la *Figura 32*, la DQO presenta una tendencia descendente debido a la degradación de los compuestos orgánicos durante el ensayo. Existe degradación en las 4 muestras estudiadas, incluso en los controles en los que no se ha adicionado hongo. Esto se debe a la degradación de los compuestos por parte de la microflora que forma parte de la muestra inicial. Mientras que en el control suplementado con glucosa la reducción de la DQO no permite ni siquiera alcanzar los valores iniciales de la muestra sin suplementar, en el control sin suplementar se observaron degradaciones del 32% al final del ensayo. Sin embargo, es en los experimentos en los que se ha añadido el hongo, tanto con suplementación como sin suplementación con glucosa, donde se observaron los mejores resultados. A partir de los 8 días, en ambos ensayos se alcanzaron valores de DQO similares, lo que indica que, en este caso, la adición de glucosa no sería necesaria

para permitir la activación del hongo y degradación de los compuestos. Además, en el ensayo sin suplementación tan solo fueron necesarios 4 días para alcanzar los valores mínimos de DQO, mientras que en el caso en que se adicionó glucosa es necesario el doble de tiempo para obtener similares resultados. La adicción de glucosa, por tanto, no solo no resulta necesaria, si no que alarga considerablemente los tiempos de tratamiento.

***Tabla 5**. Porcentajes de degradación de DQO (respecto a la DQO del control sin suplementar).*

Muestra	DQO degradada a los 4 días	DQO degradada a los 10 días
Control (C1)	27,6%	33,5%
Hongos (E1)	60,9%	50,9%
Glucosa (C2)	-83,1%	-20,0%
Hongo y glucosa (E2)	-20,9%	59,2%

En cuanto a los porcentajes de degradación de la DQO, tal y como se muestra en la *Tabla 5,* la adición de hongo permitió obtener degradaciones superiores 60%, tan solo en 4 días lo cual duplica la eficacia de degradación conseguida en ausencia del hongo. Los resultados aquí obtenidos, a partir de muestras de alpeorujo diluidas, son superiores al 43,5% de degradación de DQO mediante una fermentación en estado sólido del alpeorujo utilizando *P. chrysosporium*, con bagazo de azúcar de caña como soporte sólido (Aloui et al. 2007). En cambio, el tratamiento con *P. chrysosporium* de alpechín, proporcionó un 78% de degradación de la DQO en el sexto día del tratamiento (García-García et al. 2000). Aunque el intervalo óptimo de actuación del hongo oscila entre 4 y 6, es posible que el aumento de degradación de la DQO esté favorecido a pH más cercanos a pH 4, tal y como fue realizado en el ensayo de García-García et al. (2000), y menos próximos a pH 6. Otra diferencia en la metodología realizada por García-García es la utilización de una muestra autoclavada, lo que podría sugerir que el hongo presente una mayor actividad en la degradación de DQO en ausencia de las bacterias endógenas que compitan por el sustrato. Otra opción es que el tratamiento con autoclave contribuya a la rotura de moléculas complejas presentes en el residuo que puedan ser más fácilmente atacadas por los enzimas liberados y utilizados por el hongo. Parece por tanto probable que de haber autoclavado nuestro residuo de alpeorujo, las eficacias de eliminación de DQO hubieran sido superiores. Sin embargo, hay que tener también en cuenta que el proceso de tratamiento se encarecería considerablemente.

En cuanto uso de *P. chrysosporium* para el tratamiento de otras muestras, en la bibliografía existente se obtuvieron porcentajes de degradación de DQO del 57%

utilizando aguas residuales de la industria textil, un porcentaje muy similar al obtenido en nuestro ensayo (Pakshirajan and Kheria, 2012). Utilizando otra muestra, en este caso aguas residuales de la industria del coque, la adición de *P. chrysosporium* consiguió un 68% de degradación de DQO, un resultado ligeramente mayor al obtenido con el residuo de alpeorujo. Sin embargo, este porcentaje se incrementa a un 81% si el hongo, en lugar de estar libre, está inmovilizado en chips de madera (Lu et al. 2009).

4.3. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5)

La Demanda Biológica de Oxígeno proporciona información sobre el contenido de materia orgánica biodegradable. En la *Figura 33* se muestran las diferencias entre la demanda bioquímica de oxígeno de las diferentes muestras a tres tiempos del tratamiento.

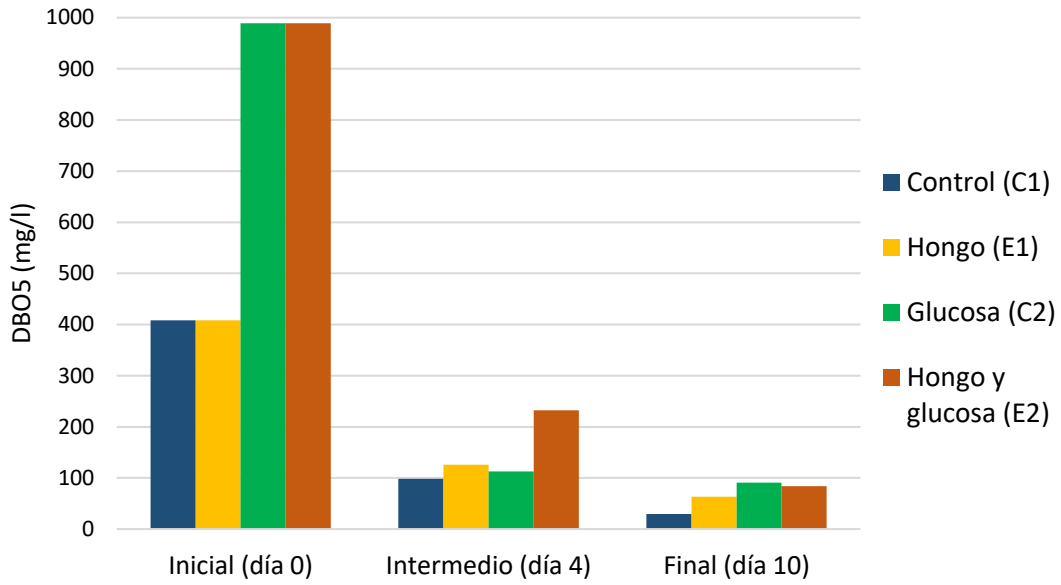

Figura 33. *DBO_5 en el momento inicial, intermedio y final del ensayo. Se muestran los valores medios de los duplicados. Las desviaciones estándar fueron en todos los casos inferiores al 26,5% del valor.*

El alpeorujo diluido (muestra inicial) presentaba una DBO_5 de 408 mg/L, lo que indica la presencia de una cierta cantidad de materia orgánica fácilmente degradable, que, tal y como se ha comentado anteriormente, resultó suficiente para promover la actividad enzimática de los hongos sin necesidad de añadir una fuente de carbono adicional. Lógicamente, los medios suplementados con glucosa muestran una DBO_5 mayor, debido a la adición de este azúcar de fácil asimilación. Tanto en las muestras suplementadas con hongo como en los dos controles sin el mismo, se muestra una clara disminución de la DBO_5 a lo largo del tratamiento. Es evidente que en la muestra inicial existen bacterias endógenas capaces de eliminar la materia orgánica fácilmente biodegradable. La adición de *P. chrysosporium* permite la liberación de enzimas capaces de romper la materia orgánica recalcitrante que pasa a convertirse en materia orgánica biodegradable. A medida que se va produciendo esta conversión de la materia orgánica compleja en compuestos más fácilmente asimilables, estos van siendo consumidos por los hongos y bacterias presentes en el medio, lo que se refleja en el descenso de la DQO comentado en el apartado previo, al tiempo que se mantienen similares valores de DBO_5.

4.4. Biodegradabilidad

Este parámetro obtenido a partir del cociente entre la DBO_5 y la DQO indica el grado de biodegradabilidad de la materia orgánica contenida en la muestra. En la *Figura 34* se muestra la evolución de la biodegradabilidad a tres tiempos del tratamiento, inicial, intermedio y final.

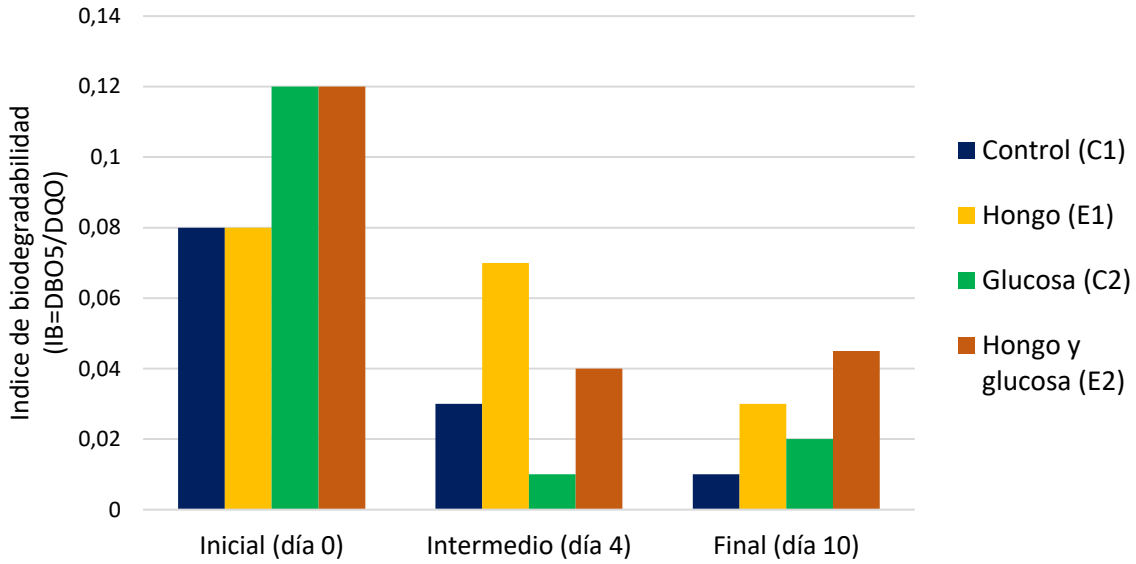

Figura 34. *Biodegradabilidad en el momento inicial, intermedio y final del ensayo.*

La biodegradabilidad inicial del alpeorujo diluido es de 0,08, valor muy inferior a 0,5, lo que indica que se trataba de una muestra muy poco biodegradable (Meena et al. 2019). Lógicamente, la adición de glucosa aumentó la biodegradabilidad de la muestra hasta 0,12, si bien sigue siendo un agua poco biodegradable.

En todas las muestras la biodegradabilidad disminuye a lo largo del tratamiento, aunque se pueden apreciar ciertas diferencias. En comparación con los controles, las muestras inoculadas con hongo poseen valores de biodegradabilidad mayores, lo cual se debe a la mayor reducción de DQO que tiene lugar, gracias a la acción de los enzimas fúngicos que permiten la degradación de la materia orgánica recalcitrante. Las muestras finales siguen siendo poco biodegradables.

4.5. Carbohidratos reductores

Los carbohidratos reductores generalmente se asimilan a los azúcares utilizables por los microorganismos, con lo que dan una idea del contenido en azúcares biodegradables presentes en la muestra. La evolución de los carbohidratos reductores a lo largo del tratamiento se muestra en la *Figura 35*.

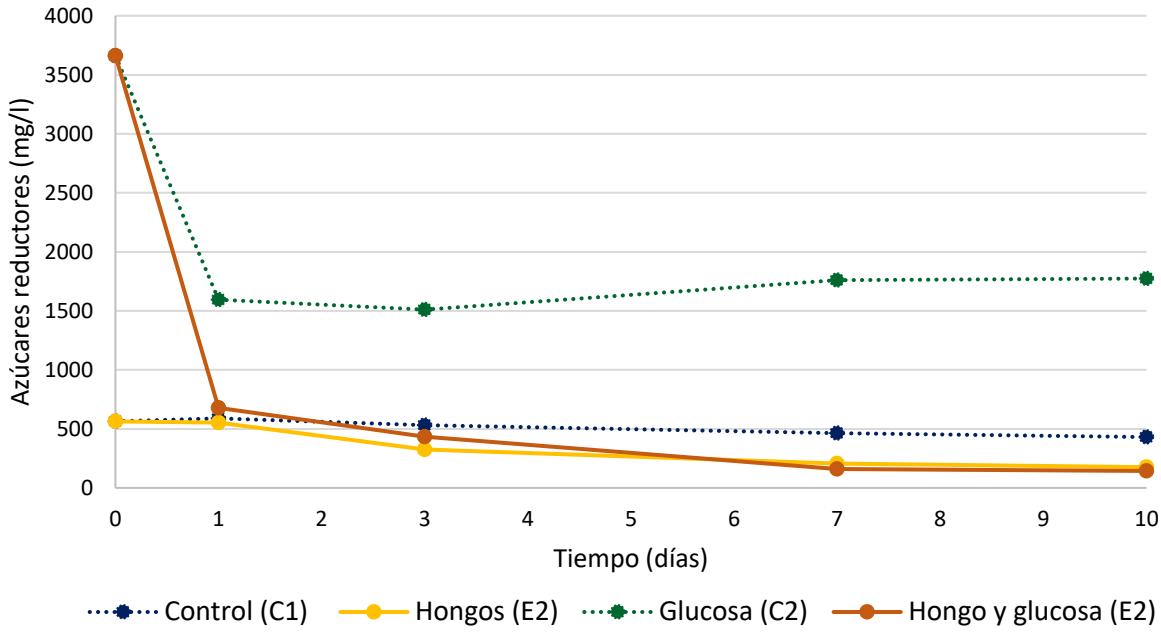

Figura 35. *Evolución de la concentración de carbohidratos reductores durante el tratamiento. Se representan los valores medios de los duplicados. En todos los puntos el valor de la desviación estándar es menor al 11% del valor.*

La concentración de azúcares reductores de la muestra inicial era de 563 mg/L, mientras que en las muestras suplementadas con 3 g/L de glucosa es de 3662 mg/L. En las muestras suplementadas con glucosa, el primer día se produjo un elevado consumo de la misma, sobre todo en la que había sido inoculada con el hongo. Por ello, en tan solo un día los niveles de azúcares reductores bajan de 3663 mg/L a 1596 mg/L en el caso del control con glucosa (C2), y a 677 en el caso de la muestra con hongo y glucosa (E2). A partir de este primer día, la concentración de azúcares reductores en el control con glucosa se mantuvo aproximadamente estable, mientras que en el medio con hongo (E2) continúa descendiendo suavemente.

En cuanto al control sin glucosa (C1), se mantiene prácticamente estable, mientras que, en el experimento sin glucosa, pero inoculado con hongo (E1), la concentración de azúcares reductores baja suavemente a partir del primer día reduciéndose hasta alcanzar

valores similares al experimento con glucosa y hongo próximos a 140 mg/L. Al igual que ocurría con la DBO_5, es lógico pensar que la evolución de la concentración de azúcares, se deba a dos efectos contrapuestos; por una parte, los enzimas fúngicos liberan azúcares reductores a partir de carbohidratos más complejos, y por otra estos azúcares reductores son consumidos por las bacterias y hongos presentes en el medio.

4.6. Fenoles totales

La presencia de fenoles es habitual en los residuos de la industria aceitera. Se realizó la medida de los fenoles totales de las muestras inicial y final con el fin de comprobar si el tratamiento ensayado conseguía disminuir la cantidad de compuestos fenólicos. Los resultados se representan en la *Figura 36*.

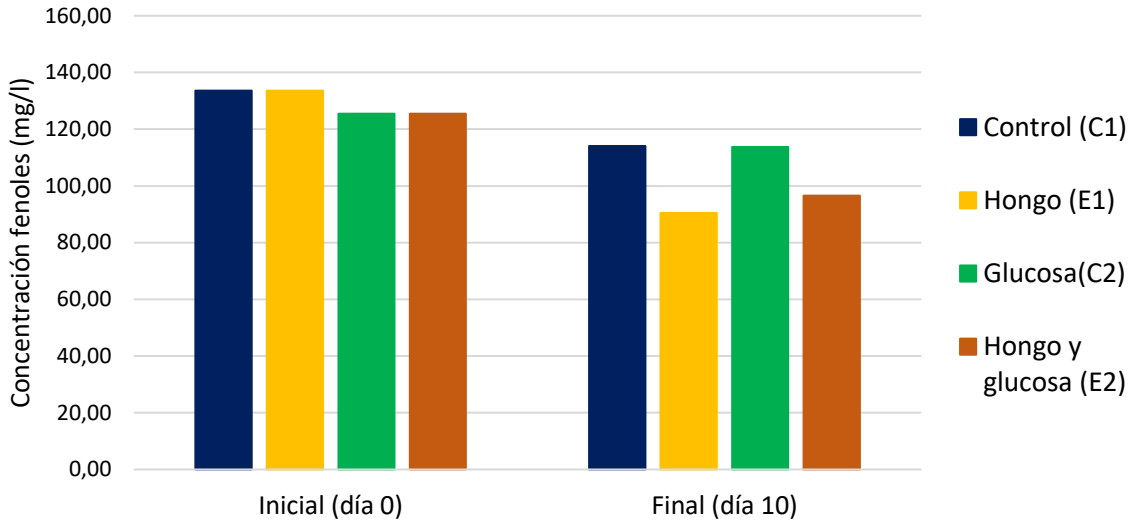

Figura 36. *Valor de los fenoles totales en el momento inicial y final del ensayo. Se representan los valores medios de los duplicados. Todos los valores de la desviación estándar son menores al 4%.*

Como se muestra en la figura la eficacia de la degradación de los fenoles fue superior en los ensayos inoculados con hongo que en los controles sin inocular. Los porcentajes de degradación se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. *Porcentajes de degradación de fenoles totales*

Muestra	Fenoles degradados a los 10 días
Control	14,7%
Hongo	32,3%
Control glucosa	14,9%
Hongo y glucosa	27,7%

Como se puede observar, añadiendo el hongo se consiguió degradar aproximadamente un 30% de los fenoles presentes en la muestra inicial, siendo ligeramente mejores los resultados obtenidos sin adición de glucosa. Así, mediante la fermentación del alpeorujo en estado sólido utilizando *P. chrysosporium* se obtiene un 57,4% de degradación de fenoles totales (Aloui et al. 2007). En cambio, García-García et al. (2000) consiguieron

degradaciones del 92% de los fenoles presentes en alpechín. De nuevo la posible explicación a la baja eficacia de eliminación obtenida en este trabajo, puede ser que en nuestro caso la muestra no fue pretratada térmicamente, mientras que en el trabajo anterior el alpechín era autoclavado, lo que pudo contribuir a degradar parcialmente los polifenoles de manera que estos pudieran ser más fácilmente degradados por el hongo.

Por otro lado, la adición de *P. chrysosporium* a aguas residuales de la industria del coque redujo los compuestos fenólicos en un 56% en tan solo 3 días de ensayo. Los porcentajes de degradación aumentaron cuando se inmovilizó al hongo en chips de madera, alcanzando un 78% de degradación (Lu et al. 2009). Parece, por tanto, posible mejorar las bajas eficacias de eliminación de fenoles obtenidas en este trabajo, mediante el pretratamiento térmico de las muestras, la inmovilización de los hongos o incluso un mejor control del pH durante el proceso.

4.7. Índice colorimétrico

En lo que respecta al color de las muestras, ya el primer día se observaron diferencias notables a simple vista entre los controles (C1 y C2) y los matraces inoculados con el hongo (E1 y E2) (ver *Figura 39)*. A medida que avanza el tiempo de tratamiento, como puede observarse en los días 7 y 10, resulta más difícil establecer visualmente el color del medio, debido al aumento de la turbidez que se produce en los medios inoculados como consecuencia del crecimiento del hongo y de la liberación de algunas de sus hifas.

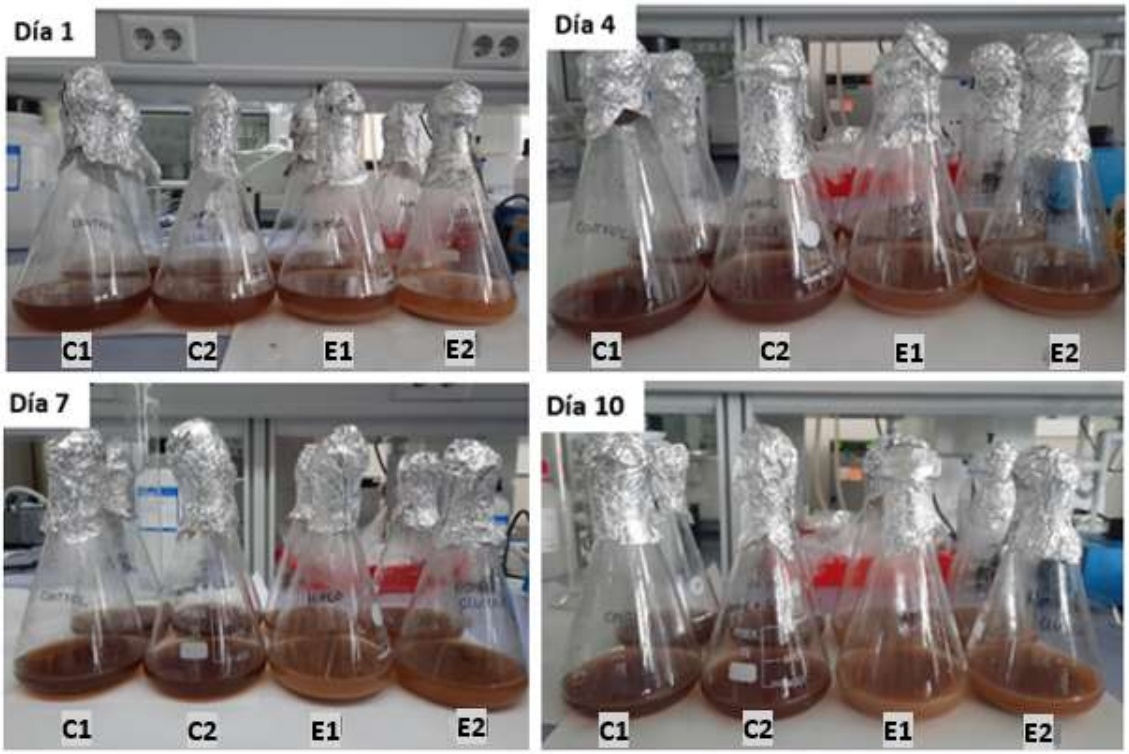

Figura 37. *Apariencia del residuo durante el ensayo realizado.*

Con el fin de poder cuantificar este cambio en el color eliminando la interferencia de la turbidez debida al crecimiento microbiano, se realizó la medida del Índice colorimétrico de las muestras. La evolución del mismo se muestra en la *Figura 37.*

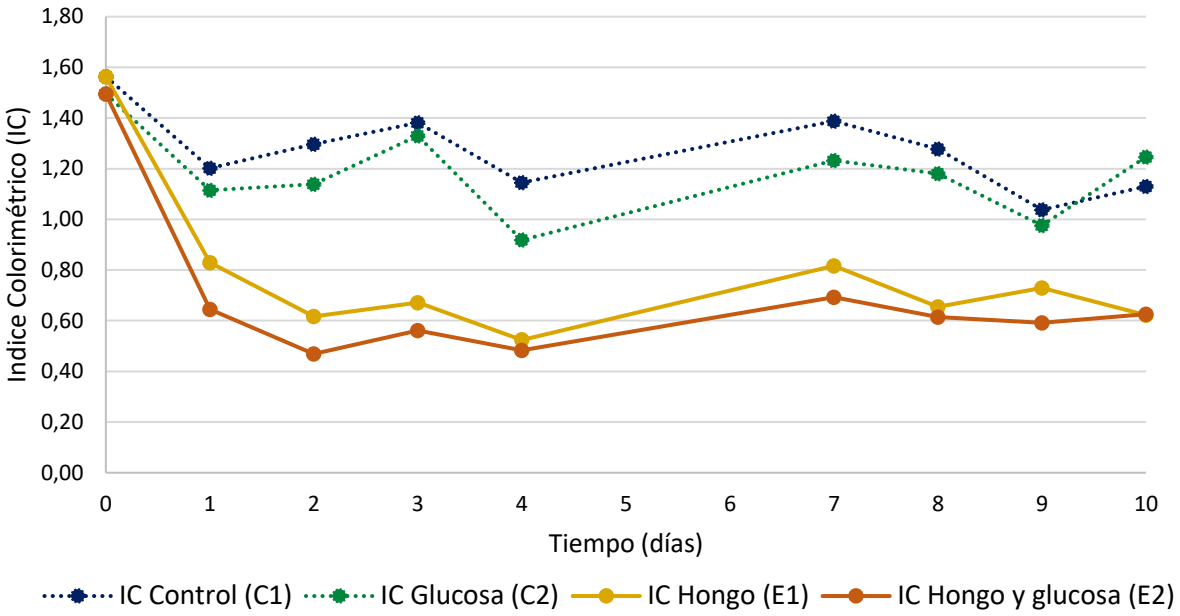

Figura 38. *Evolución del índice colorimétrico durante el tratamiento. Se representan los valores medios de los duplicados. Todos los valores poseen una desviación estándar inferior al 11,5%.*

Como se puede observar en la gráfica, se muestran dos comportamientos diferenciados. Por una parte, los controles mostraron un mayor índice colorimétrico durante todo el tratamiento con valores finales similares a los iniciales. Por otra parte, en los experimentos inoculados con hongo, el color de las muestras disminuyó de manera notable en el primer día del tratamiento, y a partir de entonces se mantuvo aproximadamente estable, siendo el índice colorimétrico conseguido con la inoculación del hongo aproximadamente la mitad del de los controles.

***Tabla** 7. Porcentajes de degradación del color al final del tratamiento.*

Muestra	Color degradado a día 10
Control (C1)	27,8%
Hongo (E1)	60,2%
Glucosa (C2)	20,3%
Hongo y glucosa (E2)	60,0%

Como se puede observar en la *Tabla 7*, en ambos ensayos (E1 y E2) se llegan a las mismas degradaciones de color, 60%. En este estudio se obtienen degradaciones de color mayores que por ejemplo en la fermentación en estado sólido de alpeorujo con *P. chrysosporium*, llegando a un 39,5% de decoloración, la cual se calculó a partir de la medición de la absorbancia a 395 nm (Aloui et al. 2007). En el caso de degradación del color de aguas residuales de la industria textil por parte de *P. chrysosporium*, se obtuvo un 64% de

degradación del mismo, un valor muy similar al que se ha obtenido con alpeorujo diluido (Pakshirajan and Kheria, 2012).

4.8. Sólidos totales

Se midieron los sólidos totales al principio y al final del tratamiento con el fin de determinar el grado de crecimiento de los microorganismos presentes en los medios.

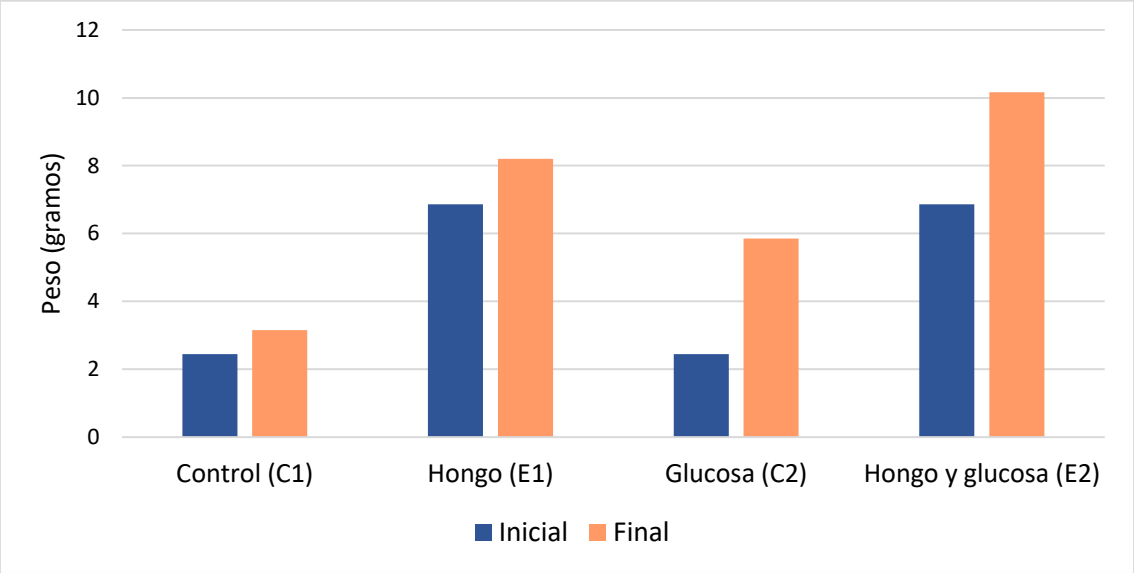

Figura 39. *Incremento del peso seco de la muestra tras el tratamiento. Se representan los valores medios de los duplicados. La desviación estándar en todos los casos es inferior al 6%.*

En la *Figura 39* se observa como el peso seco ha aumentado en todos los casos tras el tratamiento. Aunque las características físico-químicas del residuo de alpeorujo son las ideales para el crecimiento de *P. chrysosporium*, también ha favorecido el crecimiento de bacterias endógenas (Dhouib et al. 2006). Por ello, en el caso de los controles el aumento de peso se puede atribuir al crecimiento de bacterias endógenas, y en el caso de las muestras con hongo, al crecimiento del hongo y de bacterias endógenas.

Tabla 8*. Incremento de sólidos totales durante los tratamientos*

Muestra	Aumento peso tras el tratamiento
Control	28,8%
Hongo	19,5%
Control Glucosa	139,0%
Hongo y glucosa	50,0%

Como era de esperar, las mayores diferencias de peso se obtienen en los matraces en los que se ha adicionado glucosa, la cual facilita el crecimiento tanto de las bacterias endógenas como del hongo. Como se observa en la *Tabla 8,* el mayor crecimiento relativo se registró en el control con glucosa, con un incremento de peso del 139%, lo que supone que concentración microbiana final fue más del doble de la que había inicialmente. En

este caso, se produjo un mayor crecimiento de las bacterias endógenas del alpeorujo ya que no están compitiendo por los nutrientes con el hongo y disponen de una fuente de carbono fácilmente utilizable. En términos absolutos, la mayor concentración microbiana se alcanzó en el experimento con hongo y glucosa.

***Tabla 9**. DQO consumida por gramo de microrganismo formado*

Muestra	DQO consumida [mg/l]/gramo de microrganismo formado
Control (C1)	2305,7
Hongos (E1)	1847,8
Glucosa (C2)	1003,7
Hongo y glucosa (E2)	2203,9

En la *Tabla 9* se muestra para cada ensayo la DQO consumida por peso de microrganismo crecido. Si bien es cierto que no se muestra una relación constante entre la cantidad de DQO degradada y la cantidad de microrganismos que se han formado, los resultados tampoco son demasiado dispares y oscilan entre 1000 y 2300 mg/l·g.

5. CONCLUSIONES

1. La microflora endógena del residuo de alpeorujo permite degradar un 28% de la DQO presente en la muestra, si bien no se observa ninguna reducción significativa del color.

2. El tratamiento de alpeorujo diluido 1:20 mediante *P. chrysosporium* permite alcanzar una degradación del 60% de la DQO en 4 días de tratamiento.

3. La adición de *P. chrysosporium* permite, además, una reducción del índice de color del residuo del 60%.

4. La adición de azúcar no se muestra necesaria para activar el hongo, ya que el propio residuo de alpeorujo dispone de suficientes compuestos orgánicos fácilmente biodegradables, y además ralentiza el proceso de tratamiento.

5. No existen diferencias muy notorias respecto a la demanda bioquímica de oxígeno y biodegradabilidad entre controles y muestras con hongo, lo cual indica la principal diferencia entre *P. chrysosporium* y estas bacterias es su capacidad para degradar compuestos más recalcitrantes.

6. Se produce una reducción en la demanda biológica de oxígeno y en el contenido de azúcares reductores durante todos los tratamientos, si bien la biodegradabilidad de las muestras tratadas con hongo es superior a las obtenidas en ausencia de inoculación.

7. El tratamiento con el hongo del residuo de alpeorujo diluido logro degradar el 32% de los fenoles totales presentes inicialmente en la muestra.

8. En todos los ensayos realizados se produjo el crecimiento de los microrganismos presentes: las bacterias endógenas y el hongo. La suplementación con glucosa provoca un incremento en el crecimiento de los mismos, aunque esto no implica una mayor degradación de la DQO.

6. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

C1: Alpeorujo diluido

C2: Alpeorujo diluido suplementado con fuente de carbono

DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

DOP: Denominación de Origen Protegida

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DBO_5: Demanda Bioquímica de Oxígeno de 5 días de análisis

DBO_{final}: Demanda Bioquímica de Oxígeno para la oxidación completa de la totalidad de la materia orgánica biodegradable

E1: Alpeorujo diluido inoculando hongo

E2: Alpeorujo diluido suplementado con fuente de carbono inoculando hongo

IC: Índice Colorimétrico

IOC: International Olive Council

LiP: Lignina Peroxidasa

ME: Extracto de malta

MEA: Extracto de malta con agar

MnP: Manganeso Peroxidasa

P. chrysosporium: Phanerochaete chrysosporium

RGO: Reduced Graphene Oxide

SAC: Coeficiente de Absorbancia Espectral

7. BIBLIOGRAFÍA

Abrunhosa, L., Oliveira, F., Dantas, D., Gonçalves, C. and Belo, I. (2012). Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mil wastewater.

Aloui, F., Abid, N., Roussos, S. and Sayadi. S. (2007). Decolorization of semisolid olive residues of "alperujo" during the solid-state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger.* 120-125. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07000101

Ayed, L., Bouguerra, A., Charef, A., Bakhrouf, A. and EL Mzoughi, R. (2019). Biodegradation of Olive Mill Wastewater by a newly isolated novel bacterial consortium under RSM optimized culture conditions. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214714419307573

Basu, S., Gaur, R., Gomes, J., Sreekrishnan, T.R. and Bisaria V.S. (2002). Effect of seed culture on solid-state bioconversion of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* for animal feed production. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172302800494

Battista, F., Debora, F. and Ruggeri, B. (2014). Polyphenols concentration's effect on the biogas production by wastes derived from olive oil production.

Borroni, V., González, M.T. and Carelli, A.A. (2017). Bioproduction of carotenoid compounds using two-phase olive mill waste as the substrate. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316307668

Carrera, J., Montes, R., and Suárez-Ojeda, ME. (2019). Aguas residuales industriales en Iberoamérica: industria del aceite de oliva.

Çaynak, S., Gürü, M., Biçer, A., Keskin, A., and Içingür, Y. (2009). Biodiesel production from pomace oil and improvement of its properties with synthetic manganese additive.

Chen, Y., Chen, Y., Li, Y., Wu, Y., Zeng, Z., Xu, R., et al (2019). Changes of heavy metal fractions during co-composting of agricultural waste and river sediment with inoculation of *Phanerochaete chrysosporium.* Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389419307009

Chen, Y., Chen., Y., Li, Y., Wu, Y., Zhu, F., Zeng, G., et al. (2018). Application of Fenton pretreatment on the degradation of rice straw by mixed culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Aspergillus niger*. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017308233

Cullen, D. and Kerste, P.J. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. Biochemistry and Molecular Biology.

Dermeche, S., Nadour, M., LArroche, C., Moulti-Mati, F. and Michaud, P. (2013). Olive mil wastes: Biochemical characterization and valorization strategies.

Dhouib, A., Aloui, F., Hamad, N and Sayadi, S. (2006). Pilot-plant treatment of olive mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305002643

European Comission (2019). UE agricultural Outlook. For markets and income 2019-2030.

Espadas-Aldana, G; Vialle, C; Belaud, JP; Vaca-Garcia, C. and Sablayrolles, C. (2019). Analysis and trends for Life Cycle Assessment of olive oil production. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352550919300533

Fadil, K., Chahlaoui, A, Ouahbi, A., Zaid, A. and Borja, R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830502000732

Floudas, D. and Hibbett, D. (2015). Revisiting the taxonomy of *Phanerochaete* (*Polyporales, Basidiomycota*) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614615000574?via%3Dihub

García-García, I., Jiménez-Peña, P.R., Bonilla-Venceslada, J.L., Martín-Martín, A., Martín-Santos, M.A. and Ramos-Gómez, E. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum.* Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959299001351

Gassara, F., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Verma, M. and Surampalli, R.Y. (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium.* Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X10000549

Guarino, F., Falcone, G., Stillitano, T., De Luca, A.I., Gulisano, G., Mistretta, M. Et al. (2019). Life cycle assessment of olive oil: A case study in southern Italy. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479719302968#bib33

Guo, X., Peng, Z., Huang, D., Xu, P., Zeng, G., Zhou, S., et al (2018). Biotransformation of cadmium-sulfamethazine combined pollutant in aqueous environments: *Phanerochaete chrysosporium* bring cautious optimism. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138589471830665X

Hammel, KE and Cullen, D (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526608000319

Lu, Y., Yan., L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J. and Zhang, J. (2009). Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium.*

Lee, Z.S., Chin, S.Y., Lim, J.W., Witoon, T. and Cheng, C.K. (2019). Treatment technologies of palm oil mill effluent (POME) and olive mill wastewater (OMW): A brief review. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186419300690#b57

Martínez Torres, J. M., (2018) Efecto de la inclusión de orujo de aceituna (alperujo) en la dieta de cerdos de cebo sobre la productividad, la digestibilidad y la calidad del producto final. Disponible en: http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/8071/TFGUEX_2018_Martinez_Torres.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Meena, M.D., Yadav, R.K., Narjary, B., Yadav, G., Jat, H.S., Sheoran, P., et al. (2019). Municipal solid waste (MSW): Strategies to improve salt affected soil sustainability: A review.

Meksi, N., Haddar, W., Sammami, S. and Mhenni, M.F. (2012). Olive mill wastewater: a potential source of natural dyes for textile dyeing.

Mendoza, A. (1994). El orujo de aceituna: evolución, estado actual y perspectivas.

Messineo, A., Picciotto, M. and Volpe, R. (2019). Biomethane recovery from olive mill residues through anaerobic digestion: A review of the state of the art technology. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719355020

Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema, J.M. (2002). Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium.* Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135401003840

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. Disponible en: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60147a030

Mohammadi, A. and Nasernejad, B. (2009). Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408005207

Montaño, J. and Segura, JD. (1986). Compost production using vegetation water and other agricultural by-products. Proc. International symposium on the olive by-products valorization.

Moya-Ramirez, I., Altamajer-Vaz, D., Banat, I.M., Marchant, R., Jurado-Alameda, E. and García-Román, M. (2016). Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416000286

Nogales, R., Delgado, L., Cifuentes, C., Peña, A., Benítez, E. Romero, E. et al, (2007). Aprovechamiento y valorización de residuos de las industrias del aceite de oliva como enmiendas orgánicas para controlar fitopatógenos de cultivos y mitigar los efectos adversos de plaguicidas en agricultura.

Ohm, RA; Riley, R; Salamov, A; Min, B; Choi, IG and Grigoriev, IV (2014). Genomics of wood-degrading fungi. Disponible en: https://mycocosm.jgi.doe.gov/Phchr2/Phchr2.home.html

Pakshirajan, K. and Kheria, S. (2012). Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized Phanerochaete chrysosporium in a rotating biological contactor reactor.

Pellinen, J., Abuhasan, J., Joyce, T.W. and Chang, H.M. (1989). Biological delignification of Pulp by *Phanerochaete chrysosporium*.

Pinto-Ibieta, F., Serrano, A., Jeison, D., Borja, R. and Fermoso, FG. (2016). Effect of cobalt supplementation and fractionation on the biological response in the biomethanization of olive mill solid waste.

Ramos Ayerbe, F. (1986). Application for extracted olive residue. Proc. International Symposium on Olive by-products Valorization.

Ramos-Román, M.J., Jiménez-Moreno, G., Scott Anderson, R., García-Alix, A., Camuera, J., Mesa-Fernandez, J.M. et al. (2019). Climate controlled historic olive tree occurrences and olive oil production in southern Spain. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092181811930181X

Ramos-Comerzana, A. and Monteoliva-Sanchez, M. (2000). Potencial Biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola.

Rodriguez, S., Longo M.A., Camaselle, C. and Sanromán, A., (1998). Influence of some inducers on activity of ligninolytic enzymes from corncob cultures of *Phanerochaete chrysosporium* in semi-solid-state conditions. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921042398801068?via%3Dihub

Rozzi, A and Malpei, F. (1997). Tratamiento y eliminación de los efluentes del aceite de oliva. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830597887276

Salomone, R. and Ioppolo, G. (2012). Environmental impacts of olive oil production: a Life Cycle Assessment case study in the province of Messina (Sicily). Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652611003751

Senthilkumar, S., Perumalsamy, M. and Janardhana Prabhu, H. (2014). Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610311001980

Syed, K. and Yadav, J. (2012). P450monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Disponible en:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3567848/

Taha, M., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Foda, M.F., Clarke, B., Roddick, F. Et al (2018). Bioremediation of biosolids with *Phanerochaete chrysosporium* culture filtrates enhances the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139317307011

Tziotzios, G., Michailakis, S. and Vayenas, D.V. (2007). Aerobic biological treatment of olive mill wastewater by olive pulp bacteria. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830507000376

Yang, H., Ma, Q., Yilihamu, A., Yang, S., Zhang, Q., Feng, A. and Yang, S.T. (2019). Fungal transformation of graphene by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518319763

Zhao, M., Zhang, C., Zeng, G., Huang, D and Cheng, M. (2016). Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in *Phanerochaete chrysosporium.* Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1003632616642450

BUSQUEDAS EN INTERNET:

Web 1: www.pieralisi.com Para los procesos de producción del aceite de oliva y la maquinaria necesaria.

Web 2: http://acesur.com/ Para ver el proceso de producción del aceite y de generación del residuo empleado en el proyecto.

Web 3: http://www.rcsb.org/ (PDB). Para la estructura tridimensional de las proteínas LiP y MnP.

PDB ID: 1b80 (LiP) y PDB ID: 1mn1 (MnP).

Web 4: Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, 2017. https://www.juntadeandalucia.es/institutodeestadisticaycartografia/atlashistoriaecon/atlas_cap_15.html

Web 5: www.mapa.gob.es Para las Denominaciones de Origen Protegidas en España