

OLI-57

DISMINUCIÓN POR HONGOS SAPROBIOS DE LA FITOTOXICIDAD DEL ALPEORUJO SECO Y EXTRACTADO. OPTIMIZACIÓN DE SU USO COMO FERTILIZANTE BIOLÓGICO Y PARA CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS. CAO01-008.

E. Aranda, I. Sampedro, J. Martín, M. A. Delgado, C. Arriagada, I. García-Romera y J. A. Ocampo
Dpto. Microbiología del suelo y sistemas simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC,
C/ Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España, E-mail: elisabet.aranda@eez.csic.es

FORO DEL OLIVAR Y MEDIO AMBIENTE

RESUMEN

El objetivo principal del proyecto era transformar el alpeorujillo seco y extractado en fertilizante biológico con capacidad de control de hongos fitopatógenos. Este objetivo final se ha abordado a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Determinación de los componentes de la fitotoxicidad del alpeorujillo seco y extractado.
2. Selección de hongos saprobios que disminuyen la fitotoxicidad del alpeorujillo. Estudio de los mecanismos por los que los hongos saprobios eliminan la fitotoxicidad del alpeorujillo.
3. Evaluación del impacto del uso del alpeorujillo transformado como fertilizante biológico sobre la microflora total del suelo y sobre el control de hongos fitopatógenos.

OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto era transformar el alpeorujillo seco y extractado en fertilizante biológico con capacidad de control de hongos fitopatógenos. Este objetivo final se ha abordado a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Determinación de los componentes de la fitotoxicidad del alpeorujillo seco y extractado.
2. Selección de hongos saprobios que disminuyen la fitotoxicidad del alpeorujillo. Estudio de los mecanismos por los que los hongos saprobios eliminan la fitotoxicidad del alpeorujillo.
3. Evaluación del impacto del uso del alpeorujillo transformado como fertilizante biológico sobre la microflora total del suelo y sobre el control de hongos fitopatógenos.

METODOLOGÍA DEL TRABAJO EMPLEADA

Objetivo 1. Dentro de este objetivo se ha sometido al alpeorujillo seco y extractado a una serie de extracciones fraccionadas utilizando diferentes solventes y se ha determinado la fitotoxicidad de las distintas fracciones de alpeorujillo obtenidas tanto a nivel de germinación de semilla como en base al crecimiento de las distintas plantas hortícolas en el invernadero.

Objetivo 2. En este objetivo hemos determinado cuáles son los hongos saprobios, tanto del suelo como de la madera, que son capaces de crecer en el alpeorujillo y a la vez disminuir la fitotoxicidad de este. Una vez establecidos los hongos más efectivos se han estudiado los mecanismos enzimáticos que utilizan estos para la eliminación de la fitotoxicidad. Asimismo se ha llevado a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujillo seco y extractado y hemos estudiado la influencia de los hongos saprobios seleccionados como más efectivos en la fracción fenólica del alpeorujillo.

Objetivo 3. Se han realizado estudios sobre el impacto del alpeorujillo transformado para su uso como fertilizante biológico sobre la microflora del suelo mediante métodos tradicionales tanto microbiológicos como de las actividades enzimáticas del suelo así como mediante una aproximación molecular. Por otro lado se ha ensayado *in vitro*, la acción de alpeorujillo control y el incubado con los distintos hongos saprobios considerados como antagonistas sobre los hongos patógenos *Verticillium dahliae* y *Phytophthora nicotianae*.

INNOVACIÓN Y RELEVANCIA DEL TRABAJO

La innovación de este trabajo es la búsqueda de nuevas alternativas que posibiliten la adecuada reutilización y posterior valorización de la gran cantidad de alpeorujos que se genera en Andalucía. Se pretende el uso de estos subproductos en el sector agrícola siendo compatible con el mantenimiento del medioambiente.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Objetivo 1. Las distintas fracciones realizadas mostraron una fitotoxicidad diferente, así el extracto acuoso fue el más fitotóxico tanto en germinación de semilla como en crecimiento de plantas en el invernadero y sin embargo la fracción no permeable del extracto de acetato de etilo resultó ser la menos fitotóxica. Esto indica que la mayoría de los elementos fitotóxicos del alpeorujos están presentes en la fracción acuosa de este, aunque cada una de las fracciones posee elementos fitotóxicos. Hemos observado que alguna de las fracciones de alpeorujos incubadas con los hongos saprobios, administradas a bajas concentraciones, funcionan como fertilizante orgánico ya que aumentan el índice de germinabilidad y el crecimiento de las plantas con respecto al control sin alpeorujos. Por otro lado, también hemos observado que la fitotoxicidad del alpeorujos sólido resultante tras los distintos fraccionamientos se reduce considerablemente dependiendo del extractante.

Con los resultados obtenidos en este objetivo podemos concluir que mediante un fraccionamiento del alpeorujos podemos por un lado obtener extractos que tras la incubación con determinados hongos saprobios y administrados a bajas concentraciones funcionan como fertilizantes orgánicos y por otro obtener un alpeorujos resultante del fraccionamiento con un poder fitotóxico menor y por tanto más factible de biorremediar con hongos saprobios en menor espacio de tiempo.

Objetivo 2. Hemos encontrado que la mayoría de los hongos saprobios probados disminuyen la fitotoxicidad del alpeorujos aunque su efecto varía dependiendo de los hongos utilizados y del tiempo de incubación del alpeorujos con estos. Esta distinta actuación de los hongos saprobios se debe posiblemente a las diferencias en la maquinaria enzimática de cada hongo implicado en la degradación de los compuestos tóxicos. Algunos de los hongos saprobios, tales como *F. lateritium*, *F. oxysporum* 738, *C. rigida*, y *P. radiata* transformaron totalmente el alpeorujos seco y extractado después de su incubación durante 20 semanas, eliminando totalmente la fitotoxicidad.

Uno de los mecanismos por los que los hongos eliminan la fitotoxicidad del alpeorujos seco y extractado que hemos puesto de manifiesto es que los hongos saprobios seleccionados disminuyen el contenido fenólico total del alpeorujos. Hemos observado que hay una relación bastante estrecha entre la disminución de la fitotoxicidad del alpeorujos y la disminución de fenoles totales por los hongos saprobios. También hemos observado que la producción de enzimas degradativos de fenoles en estos procesos de biorremediación ha sido muy baja si los comparamos con la proporción de fenoles que aparentemente se degradan. Por otro lado hemos observado que los niveles de lignina no disminuyen a lo largo de los experimentos de incubación como cabría esperar de un proceso típico de degradación. Tenemos indicios para pensar que la incubación del alpeorujos con los hongos saprobios provocaría no una eliminación de los compuestos fenólicos simples ya que las enzimas encargadas de esta acción estarían inhibidas por el propio residuo sino una polimerización de los compuestos fenólicos que conllevaría también una disminución de la fitotoxicidad como se ha descrito en la bibliografía.

Si bien la fitotoxicidad del alpeorujos parece deberse, principalmente, a la modificación del contenido fenólico del mismo, nuestros resultados indicaron que la fitotoxicidad del alpeorujos también puede deberse a otros compuestos distintos de los fenoles. De hecho hemos observado también una correlación entre la disminución de la fitotoxicidad y la producción de enzimas hidrolíticos por lo podemos pensar que los hongos saprobios poseen varios mecanismos de detoxificación del alpeorujos entre los que se encuentran la disminución o polimerización de compuestos fenólicos y la producción de enzimas hidrolíticos.

Los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujos seco y extractado son hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol, tirosol, salidroside, glucósido de luteolina, rutina y oleuropeina. Todos los hongos saprobios ensayados tras dos semanas de incubación con el alpeorujos disminuyeron los fenoles descritos, sin embargo, cada uno de ellos mostró una pauta distinta de comportamiento en cuanto a proporción y compuesto fenólico que disminuía. Hemos observado que tras 20 semanas de

incubación la proporción de fenoles en las muestras de alpeorujos incubadas con todos los hongos saprobios ensayados es prácticamente nula. Aunque hemos descrito que a las 2 semanas de incubación con hongos saprobios hubo un descenso acusado de la cantidad de fenoles no observamos una disminución paralela de la fitotoxicidad al mismo tiempo. Estos resultados afianza nuestra hipótesis apuntada anteriormente de que la fitotoxicidad del alpeorujos no se debe exclusivamente a los compuestos fenólicos.

Estos resultados nos llevan a concluir por una parte que los hongos saprobios poseen varios mecanismos de detoxificación del alpeorujos entre los que se encuentran la disminución o polimerización de compuestos fenólicos y la producción de enzimas hidrolíticas. Por otro lado también hemos podido constatar que los compuestos fenólicos presentes en el alpeorujos seco y extractado son hidroxitirosol, glucósido de hidroxitirosol, tirosol, salidroside, glucósido de luteolina, rutina y oleuropeina.

Objetivo 3. Mediante los métodos tradicionales del estudio de la microflora del suelo se ha observado que estas técnicas no permiten constatar una diferencia clara en cuanto al aumento o disminución de microorganismos tras la adición de alpeorujos a un suelo. Por ello y debido a que los métodos tradicionales para la identificación de microorganismos tienen su aplicabilidad limitada para los temas de biorremediación hemos estudiado la heterogeneidad mediante una aproximación estructural llevada a cabo por electroforesis de ADN de la comunidad microbiana del suelo en gradiente de temperatura (TGGE). Los ensayos realizados indican que la población de microorganismos se modifica tras la adición de alpeorujos.

En cuanto al control de patógenos, los resultados de los experimentos muestran que el alpeorujos no inhibe el desarrollo de los hongos patógenos. Se hizo un estudio con 150 hongos saprobios para determinar cual de ellos eran antagonistas de los hongos patógenos. Con los hongos antagonistas seleccionados hemos observado in vitro, que algunos mantienen o son más eficaces en su capacidad antagónica frente a los patógenos cuando se cultivan en alpeorujos.

En conclusión, se ha observado impacto del alpeorujos transformado para su uso como fertilizante biológico sobre la microflora del suelo mediante aproximaciones moleculares. También se ha podido constatar que el alpeorujos incubado con hongos antagonistas de distintos patógenos aumenta dicha capacidad.