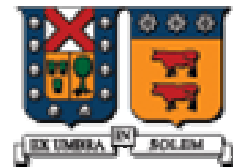


UNIVERSIDAD DE GRANADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



TESIS DOCTORAL

**BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO UTILIZANDO
HONGOS DEL GÉNERO *PLEUROTUS* Y ANÉLIDOS
DE LA ESPECIE *EISENIA FOETIDA***

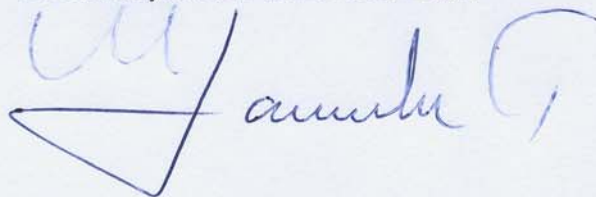


Manuel Saavedra González
Granada, 2007

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

**BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO UTILIZANDO
HONGOS DEL GÉNERO *PLEUROTUS* Y ANÉLIDOS
DE LA ESPECIE *EISENIA FOETIDA***

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor
por la Universidad de Granada
Granada, 8 de Marzo del 2007**

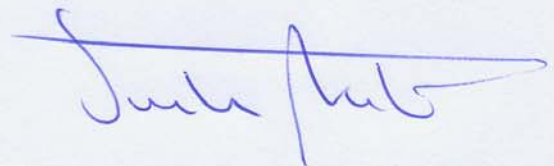


Fdo. Manuel Saavedra Gonzalez
Magíster en Educación Ambiental

Directores de la Tesis Doctoral



Fdo. Dr. Rogelio Nogales Vargas-Machuca
Dr. en Ciencias Biológicas
Investigador Científico CSIC



Fdo. Dr. Emilio Benítez León
Dr. en Ciencias Biológicas
Científico Titular CSIC

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Agroecología y Protección Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada. El presente estudio se encuadró dentro de los objetivos científicos-técnicos propuestos en dos Proyectos de Investigación, uno subvencionado por Comisión Interministerial del Ciencia y Tecnología "AGL2000-1424-CO2-01 Nuevas alternativas para la recuperación y valorización de los subproductos agroindustriales del sector olivarero. I. Optimización de su uso para el control de fitopatógenos, sustratos de cultivos de setas y biorrecuperación de suelos contaminados por metales pesados" y el otro por la Conserjería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía "CAO01-007-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." Para la realización del presente trabajo D. Manuel Saavedra González disfrutó de una Beca concedida por la Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

A mi familia

"Cuando crezcas, descubrirás que ya defendiste mentiras, te engañaste a ti mismo o sufriste por tonterías. Si eres un buen guerrero, no te culparás por ello, pero tampoco dejarás que tus errores se repitan."

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

Desde el primer momento en que se comenzó a gestar esta Tesis muchas han sido las personas e instituciones que se han involucrado conmigo para hacerla realidad, y a quienes deseo expresar mi gratitud por el apoyo y la cooperación que me han prestado de forma desinteresada.

A quienes primero quiero manifestar mi más sincera admiración y reconocimiento es a mis Directores de Tesis, Dr. Rogelio Nogales Vargas-Machuca y Dr. Emilio Benítez León. Al Dr. Nogales por haberme permitido trabajar con su equipo humano de investigación, su disposición a enseñarme, por permitirme compartir con su familia y sinceramente creo que durante estos años además de una Tesis he logrado un amigo. Al Dr. Benítez por mostrarme los caminos de la ciencia y la paciencia en el trabajo experimental, por su amistad y por el esfuerzo de hacerme una estadía mas grata en Granada.

A la Dra. Mercedes Campo por su ejemplo de dedicación profesional, por su actitud siempre afectuosa y cálida con quienes compartimos con ella, y por su buena disposición a ayudar a todo aquel que lo requiera.

Deseo también agradecer al Dr. José Miguel Barea, quien siendo Director de la Estación Experimental aceptó mi participación en el curso UNESCO y una estancia breve en el Departamento de Agroecología, además de permitirme conocer *in extenso* España.

A La Dra. Rosario Azcón por su por su buena disposición a compartir sus conocimientos y muestras de micorrizas.

A Celia deseo agradecerle muy sinceramente por su ayuda desinteresada en la parte experimental de esta Tesis Doctoral, como asimismo por su celo profesional y por su marcado deseo de superación profesional y humano. Es mi oportunidad para decirle que siempre le estaré eternamente agradecido.

Quisiera agradecer también a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han puesto su granito de arena para la realización de esta Tesis. Especialmente a M^a José Lorite, Amparo Salido, Jesús Fernández, Beatriz Moreno, M^a Luisa Fernández, Herminia Barroso, Estefanía Rodríguez.

A Belén Cotes por su amistad sincera y por el afecto mostrado en todo momento, por su inconmensurable alegría y disposición a superar los malos momentos. En realidad ha sido una suerte conocerle, y estoy seguro que solo las personas inteligentes sabrán valorarte en su justa medida.

Debo un especial reconocimiento al Consejo Superior de Investigaciones Científicas Estación Experimental del Zaidín (CSIC-Granada) por la calida acogida que me brindó el Departamento de Protección Ambiental (Grupo: Relación Planta-Suelo) y por haberme cedido un espacio para trabajar en sus laboratorios con el objeto de desarrollar la parte experimental de esta Tesis Doctoral.

Agradecer al Departamento de Biotecnología de la Universidad de Granada en la persona de uno de sus destacados profesores, Antonio Luis Extremera por su dedicación docente y por su disposición a atender gratamente a sus estudiantes.

Por último quisiera agradecer a la Universidad Técnica Federico Santa María-Chile por haberme dado la oportunidad y haber financiado el perfeccionamiento académico de uno de sus profesores.

ÍNDICE

OBJETO DEL TRABAJO	1
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	5
I.1. OLIVO, ACEITE DE OLIVA Y ALPERUJO	7
I.1.1. El olivo	9
I.1.1.1. El árbol	9
I.1.1.2 Hoja	10
I.1.1.3. Raíz	11
I.1.1.4 Inflorescencia	11
I.1.1.5 Flores	11
I.1.1.6. Fruto	12
I.1.2. El aceite de oliva	13
I.1.2.1. Proceso de producción de aceite de oliva	15
I.1.2.2 Composición del aceite de oliva	18
I.1.2.2.1. Triglicéridos y ácidos grasos	18
I.1.2.2.2. Fracción insaponificable	20
I.1.2.2.3. Hidrocarburos	21
I.1.2.2.4. Tocoferoles	21
I.1.2.2.5 Fitoesteroles	22
I.1.2.2.6 Compuestos polifenólicos	22
I.1.3. El alperujo	24
I.2. HONGOS: <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
I.2.1 Características taxonómicas generales de los hongos	29
I.2.2. Clasificación de los hongos	30
I.2.2.1. Subdivisión chytridiomycota	31
I.2.2.2. Subdivisión zygomycota	31
I.2.2.3. Subdivisión ascomycota	31
I.2.2.4. Subdivisión deuteromycota	32
I.2.2.5. Subdivisión basidiomycota	33
I.2.2.5.1. Subclase holobacidiomycetidae	34
I.2.2.5.2. Subclase <i>fragmobasidiomycetidae</i>	34
I.2.2.5.3. Subclase <i>teliomycetidae</i>	35
I.2.3. Hongos saprófitos	35
I.2.4. Hongos comestibles	36
I.2.5. Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
I.2.5.1. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
I.2.5.1.1. Selección y caracterización del sustrato	38
I.2.5.1.2. Preparación del sustrato	38

I.2.5.1.3. Preparación del inóculo	39
I.2.5.1.4. Siembra del inóculo e incubación	39
I.2.5.1.5. Colonización y fructificación	40
I.2.5.1.6. Cosecha	40
I.3 VERMICOMPOSTAJE: <i>Eisenia fetida</i>	43
I.3.1. Antecedentes	45
I.3.2. Definición del proceso de vermicompostaje	45
I.3.3. Organismos implicados en los procesos de vermicompostaje	46
I.3.3.1 Lombrices de tierra	46
I.3.3.2. Microorganismos	48
I.3.3.3. Fauna asociada	49
I.3.4. Factores que regulan el proceso de vermicompostaje	49
I.3.4.1 Naturaleza y acondicionamiento de los residuos orgánicos o materiales de partida	49
I.3.4.2. Humedad	50
I.3.4.3 Temperatura	51
I.3.4.4 Aireación	51
I.3.4.5. Densidad de población	51
I.3.4.6. Enemigos de las lombrices	52
I.3.5. Cambios durante los procesos de vermicompostaje	52
I.3.6 Vermicompostaje y microorganismos patógenos	54
I.3.7. Tipos de sistemas o procesos de vermicompostaje	54
I.3.7.1. Procesos a escala doméstica.	55
I.3.7.2. Procesos de vermicompostaje a escala pequeña o laboratorio.	55
I.3.7.3. Procesos de vermicompostaje a escala mediana o piloto.	55
I.3.7.4. Procesos a escala industrial.	55
I.3.8. Productos finales del proceso de vermicompostaje	56
I.3.8.1. Vermicompost- compost de lombriz-lumbricompost-humus de lombriz	56
I.3.8.2. Lombrices de tierra	58
I.3.8.3. Lixiviados de los procesos de vermicompostaje	58
I.4. BIOTRANSFORMACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS	59
I.4.1. Generalidades	61
I.4.2. Lacasa	61
I.4.3. β -glucosidasa	63
I.4.4. Degradación de celulosa	63
I.4.5. Degradación de lignina	65

CAPITULO II. BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO NATURAL POR HONGOS DE LA ESPECIE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	67
II.1. MATERIALES Y MÉTODOS	69
II.1.1. Materiales	69
II.1.2. Preparación del inóculo	69
II.1.3. Preparación de los sustratos de alperujo	69
II.1.4. Metodos utilizados para el analisis del alperujo natural y del alperujo degradado con <i>P. ostreatus</i>	69
II.1.4.1. pH	70
II.1.4.2. Conductividad eléctrica	70
II.1.4.3. Carbono orgánico total	70
II.1.4.4. Carbono hidrosoluble	70
II.1.4.5. Carbono extraíble total, acidos húmicos y ácidos fúlvicos	70
II.1.4.6. Polifenoles totales extractables	71
II.1.4.7. Actividades enzimáticas	71
II.1.4.7.1. Actividad deshidrogenasa	71
II.1.4.7.2. Actividad β -glucosidasa	71
II.1.4.7.3. actividad fosfatasa	72
II.1.4.7.4 Actividad ureasa	72
II.1.4.7.5. Actividad lacasa	72
II.1.4.7.6. Actividad manganeso peroxidasa	73
II.1.4.8. Analisis elemental	73
II.1.4.8.1. Nitrógeno kjeldahl total	73
II.1.4.8.2. Análisis de otros elementos	73
II.1.4.8.2.1. Mineralización nítrico-perclórica de las muestras	73
II.1.4.8.2.2. Fósforo total del mineralizado	74
II.1.4.8.2.3. Potasio total del mineralizado	74
II.1.4.8.2.4. Calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre y zinc del mineralizado.	74
II.1.4.9. Análisis de la fitotoxicidad	74
II.1.5. Análisis estadístico de los resultados	74
II.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
II.2.1. pH y conductividad	75
II.2.2. Actividades enzimáticas	75
II.2.3. Polifenoles y actividades enzimaticas asociadas	77
II.2.4. Fracciones orgánicas y nutrientes	79

III. BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO NATURAL UTILIZANDO LOMBRICES DE LA ESPECIE <i>EISENIA FOETIDA</i>	83
III.1. MATERIAL Y MÉTODOS	85
III.1.1. Materiales	85
III.1.2. Preparación de los recipientes	85
III.1.3. Desarrollo experimental	86
III.1.4. Análisis efectuados mensualmente durante el proceso de biodegradación de alperujo por <i>E. foetida</i> .	86
III.1.5. Análisis de los sustratos iniciales y productos finales del proceso de biodegradación de alperujo por <i>Eisenia foetida</i> .	87
III.1.6. Tratamiento estadístico de los resultados	87
III. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
III. 2.1. Evolución de la biomasa total y número de lombrices durante el proceso de biodegradación de alperujo por <i>E. foetida</i> .	87
III.2.2. Evolución del carbono hidrosoluble durante la biodegradación del alperujo por <i>E. foetida</i> .	89
III.2.3. Evolución de los polifenoles totales extraíbles durante la biodegradación del alperujo por <i>E. foetida</i> .	89
III.2.4. Actividades enzimáticas durante la biodegradación del alperujo por <i>E. foetida</i> .	90
III.2.5. Cambios en la composición del alperujo al inicio y al final del proceso de biodegradación por <i>E. foetida</i> .	93
III.2.5.1. pH y conductividad	93
III.2.5.2. Carbono orgánico total, carbono extraíble total y sustancias húmicas	93
III.2.5.3. Macronutrientes y sodio	95
III.2.5.4. Micronutrientes	96
III.2.5.5. Fitotoxicidad del alperujo al inicio y al final del proceso de biodegradación por <i>E. foetida</i> .	97
IV. BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO POR <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> Y <i>EISENIA FOETIDA</i>	99
IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS	101
IV.1.1. Materiales	101
IV.1.2. Preparación de los recipientes	101
IV.1.3. Desarrollo experimental	
IV.1.4. Análisis efectuados mensualmente durante el proceso de biodegradación por <i>E. foetida</i> del alperujo fungidegradado	102
IV.1.5. Análisis de los sustratos iniciales y productos finales del proceso de biodegradación por <i>E. foetida</i> del alperujo fungidegradado	102

IV.1.6. Tratamiento estadístico de los resultados	103
IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
IV.2.1. Evolución de la biomasa total y número de lombrices durante el proceso de biodegradación del alperujo por <i>P. ostreatus</i> y <i>E. foetida</i> .	103
IV.2.2. Evolución del carbono hidrosoluble y polifenoles extraíbles totales durante la biodegradación por <i>E. foetida</i> del alperujo degradado por <i>P. ostreatus</i>	105
IV.2.3. Evolución de las actividades enzimáticas durante la biodegradación del alperujo fungidegradado por <i>E. foetida</i>	105
IV.2.4. Evolución del carbono orgánico total, carbono extraíble total y sustancias húmicas durante la biodegradación por <i>E. foetida</i> del alperujo degradado por <i>P. ostreatus</i>	108
IV.2.5. Cambios en la composición del alperujo degradado con <i>p. ostreatus</i> al inicio y al final del proceso de biodegradación con <i>E. foetida</i>	109
IV.2.5.1. pH y conductividad	109
IV.2.5.2. Macronutrientes, sodio y micronutrientes.	110
IV.2.5.4. Fitotoxicidad del alperujo predegradado con <i>p. ostreatus</i> al inicio y al final del proceso de biodegradación por <i>E. foetida</i>	111
V. ESTUDIO SECUENCIAL DE LA BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO, NATURAL O MEZCLADO CON PAJA, MEDIANTE INOCULACIÓN CON <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	113
V.1. MATERIALES Y MÉTODOS	115
V.1.1. Residuos orgánicos	115
V.1.2. Hongo	115
V.1.3. Preparación del inóculo	115
V.1. 4. Preparación de muestras de experimentación	115
V.1.5. Diseño del experimento	116
V.1.6. Métodos utilizados para el análisis durante el proceso de biodegradación de alperujo, paja y mezclas con <i>P. ostreatus</i>	116
V.1.6.1 Hemicelulosas, celulosas y ligninas	117
V.1.6.1.1. Componentes fibrosos	117
V.1.6.1.2. Fibra neutro detergente (FND)	117
V.1.6.1.3. Fibra ácido detergente (FAD)	118
V.1.6.1.4. Lignina ácido detergente (LAD)	118
V.1.7. Tratamiento estadístico de los resultados	118
V.2 RESULTADOS Y DISCUSION	119
V.2.1. pH	119
V.2.2. Carbono orgánico total (COT)	120
V.2.3. Carbono hidrosoluble	121
V.2.4. Carbono extraíble total y ácidos húmicos	122

V.2.5. Relación carbono-nitrógeno (C/N)	124
V.2.6. Polifenoles y actividades enzimáticas asociadas	124
V.2.7. Hemicelulosa, celulosa y lignina	127
V.2.8. Actividades enzimáticas	127
V.2.8.1. Actividad deshidrogenasa	127
V.2.8.2. Actividad β -glucosidasa	129
V.2.8.3. Actividad fosfatasa	129
V.2.9. Macronutrientes	131
V.2.10. Micronutrientes	132
V.2.11. Fitotoxicidad de los sustratos iniciales y productos finales obtenidos en el proceso de degradación de alperujo y mezclas con <i>Pleurotus ostreatus</i> .	132

VI. ESTUDIO DE LAS POSIBILIDADES DE UTILIZACIÓN DEL ALPERUJO Y SUS PRODUCTOS DE BIODEGRADACION MEDIANTE HONGOS O/Y LOMBRICES COMO ENMIENDAS ORGÁNICAS DEL SUELO	135
VI.1. MATERIAL Y MÉTODOS	137
VI.1.1. Descripción y análisis del suelo	137
VI.1.2. Enmiendas orgánicas oléícolas	139
VI.1.3. Tratamientos y series realizadas	140
VI.1.4. Experimento de invernadero	141
VI.1.4.1. Preparación de las macetas	141
VI.1.4.2. Siembra y cultivo	142
VI.1.4.3. Recolección del material vegetal	142
VI.1.5. Métodos utilizados para el análisis de la planta	142
VI.1.5.1. Mineralización sulfúrica de las muestras vegetales	142
VI.1.5.2. Análisis del nitrógeno total en el mineralizado	143
VI.1.5.3. Análisis del fósforo total en el mineralizado	143
VI.1.5.4. Análisis del potasio y sodio del mineralizado	143
VI.1.5.5. Mineralización nítrico-perclórica de las muestras vegetales	143
VI.1.5.6. Análisis de micronutrientes del mineralizado	143
VI.1.5.7. Micorrización	144
VI.1.6. Métodos utilizados para el análisis del suelo postcosecha	144
VI.1.6.1. Análisis granulométrico	144
VI.1.6.2. Carbonato total del suelo	144
VI.1.6.4 Fósforo, potasio y micronutrientes asimilables del suelo	145
VI.1.7. Tratamiento estadístico de los resultados	145
VI.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	145
VI.2.1. Parametros fisiologicos del cultivo de alfalfa.	145

	Índice
VI.2.2. Nodulación y micorrización	148
VI.2.3. pH y conductividad del suelo poscosecha	151
VI.2.4. Nitrogeno en planta	152
VI.2.5. fosforo en planta y suelo poscosecha	154
VI.2.6. Potasio en planta y suelo poscosecha	156
VI.2.8. Micronutrientes en planta y suelo postcosecha	158
VI.2.9. Fracciones orgánicas en suelo	162
vi.2.10. Actividades enzimáticas en suelo postcosecha	164
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFIA	171
ANEXO. CONTRASTES POST HOC (TEST DE BONFERRONI)	195

OBJETO DEL TRABAJO

La producción de residuos orgánicos por las actividades humanas constituye un grave problema medioambiental tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo. En los 25 países de la Unión Europea, se ha estimado que anualmente se generan 1,8 billones de toneladas de residuos orgánicos. Los residuos orgánicos tienen diferentes características y composición dependiendo, fundamentalmente, de su origen agrícola, ganadero, forestal, agroindustrial y urbano.

En los últimos años, se han propuesto diferentes soluciones para la gestión y tratamiento de los residuos orgánicos, incluyendo, según orden de prioridad, las siguientes: prevención, minimización, reutilización, recuperación de energía y vertido. El vertido es la última opción y sólo debe ser utilizado cuando no existan otras soluciones de gestión. La prevención y minimización depende, por lo general, de las políticas de gestión de residuos regionales, nacionales y transnacionales. El reciclado, reutilización y la recuperación energética obliga a una investigación exhaustiva y, en la mayoría de los casos, innovadora que permita seleccionar la/s opción/es más adecuada/s, de menor coste y medioambientalmente sostenible/s que eviten los problemas debidos a aumento de la generación de residuos orgánicos.

El cultivo del olivar y la extracción del aceite de oliva son una fuente de riqueza en los países de clima mediterráneo. En España, primer productor mundial de aceite de oliva, esa actividad socioeconómica se localiza, fundamentalmente, en la comunidad autónoma andaluza. En Chile se concentra en las regiones V y VI. El nuevo sistema de extracción de aceite de oliva mediante centrifugación por dos fases ha supuesto un ahorro de agua y energía. Sin embargo genera un residuo o subproducto denominado "alperujo u orujo dos fases", semisólido, recalcitrante, de naturaleza lignocelulósica y con elevado potencial fitotóxico debido a la presencia de polifenoles (Alburquerque y col., 2004; Borja y col., 2002). En los últimos años, se ha realizado un notable esfuerzo para su aprovechamiento y valorización, siendo, actualmente utilizado, entre otros fines como enmienda orgánica del suelo (natural o previamente bioestabilizado), como biomasa renovable para la obtención de energía eléctrica y térmica, como alimento para el ganado, para otros usos previa separación de sus componentes.

Las setas de chopo (*Pleurotus ostreatus*) son hongos que colonizan diferentes tipos de residuos agrícolas e industriales. Estos hongos segregan un gran número de enzimas con capacidad para transformar ligninas, celulosas y hemicelulosas en sustancias solubles, que posteriormente son asimiladas por ellos (Morais y col., 2003). Además, diferentes especies de *Pleurotus* pueden degradar fenoles, descontaminando residuos con elevados contenidos de estos compuestos tóxicos (Aggelis y col., 2002).

Algunas especies de lombrices epigeas, como *Eisena foetida*, son utilizadas comúnmente en procesos de vermicompostaje, los cuales han demostrado una gran efectividad para biodegradar y/o biotransformar diferentes residuos agrícolas, ganaderos y urbanos (Albanell y col., 1986; Elvira y col., 1998). También han sido utilizadas para obtener enmiendas orgánicas a partir de residuos de olivar, como orujos 3 fases y orujillos (Nogales y col., 1999; Benítez y col., 2002).

La aplicación de enmiendas orgánicas de diferente naturaleza al suelo es una práctica agrícola que ha experimentado un enorme aumento en los últimos años. La razón se fundamenta, además de

en ser una práctica económicamente viable, en la mejora que promueve sobre la fertilidad y calidad física, química, bioquímica y biológica de los suelos, lo cual reduce su degradación y favorece, también, el secuestro de carbono mitigando el efecto invernadero (Lal, 2004; Tejada y col., 2007).

El **objetivo general** del presente trabajo de Tesis Doctoral conecta con las ideas que se han descrito y, de manera concreta, está dirigido a aumentar las vías de reutilización y reciclado del alperujo u orujo dos fases, mediante el desarrollo de procesos biotecnológicos permitan obtener productos finales susceptibles de ser utilizados como enmiendas orgánicas del suelo. La investigación desarrollada ha tratado de proporcionar una información útil que venga a cubrir el vacío existente sobre este tema en nuestro entorno geográfico; pero al mismo tiempo ha estado orientada hacia una serie de objetivos concretos, pioneros y vanguardistas que han permitido adquirir conocimientos inéditos sobre la temática que nos ocupa. Estos **objetivos específicos** han sido los siguientes:

1. Desarrollar y caracterizar procesos de biodegradación del alperujo natural por hongos de la especie *Pleurotus ostreatus*, lombrices de la especie *Eisenia foetida*, o por la acción combinada de ambos.
2. Profundizar en el proceso de biodegradación secuencial del alperujo natural por *P. ostreatus*, comparándolo frente al de la paja de cebada y mezclas de ambos residuos orgánicos.
3. Evaluar la posibilidad de utilización del alperujo natural y los alperujos biodegradados con *P. ostreatus* o *E. foetida* como enmiendas orgánicas del suelo, simulando a su vez condiciones de desarrollo de una agricultura convencional y biológica.

I. INTRODUCCIÓN



I.1. OLIVO, ACEITE DE OLIVA Y ALPERUJO



I.1.1. EL OLIVO

El olivo es la una de las plantas cultivadas más antiguas y cuyo origen se remonta a unos 4000-3000 años antes de Cristo en la zona de Palestina. Es muy apreciado desde la antigüedad por sus frutos, las aceitunas, y la calidad del aceite que de ellas se obtiene. Fue introducido en España por fenicios y griegos. Los romanos expandieron su cultivo por toda la península y los árabes perfeccionaron las técnicas de producción de aceite. La propia palabra "aceite" es de origen árabe, procedente de la palabra "az-zait", que quiere decir "jugo de aceituna". Fue llevado a América por los españoles, durante los siglos XVI y XVII, encontrándose actualmente en California y zonas de Sudamérica.

España ocupa el primer lugar del mundo tanto por la superficie dedicada al cultivo de olivar (2475000 ha) como por el número de olivos productivos (215.000.000) (MAPA, 2006), destacándose por su importancia la comunidad autónoma andaluza. En Chile actualmente hay dedicadas 3700 hectareas, con plantaciones ubicadas desde la III a la VIII region.

El cultivo del olivo esta distribuido en Chile desde la I Región de Tarapacá hasta la VIII Región del Bío-bío, incluso se encuentra en algunos microclimas de la IX Región de la Araucanía, dado que existen muy buenas condiciones para desarrollar una olivicultura moderna. La superficie plantada de olivos (Censo Nacional Agropecuario, 1997), se estima en unas 5300 há. De las cuales aproximadamente el 39,6 % se concentra en la III Región de Atacama, y es seguida por la I Región con un 27,2 % del total del país, más específicamente en el Valle de Azapa, una latitud algo templada para el olivo, pero que en el valle se adapto muy bien, tal es así que hoy ya es reconocido como una variedad de olivo más, denominada variedad Azapa, originaria de la variedad sevillana oriunda de España y encontrándose en valles del sur del Perú y el de Azapa Chile.

La IV Región de Coquimbo se dedicacasi exclusivamente a la producción de aceite con 270,6 há de superficie, destacándose las variedades aceiteras Arbequina, Frantoio y Leccino. La V Región de Valparaíso tiene muy poca superficie dedicada al cultivo de olivos, principalmente se desarrolla en las provincias de Petorca y San Felipe donde destacan las variedades de Ascolano y Empeltre. En la VI Región del Libertador Bernardo O'Higgins, la variedad más importante sigue siendo Sevillana, seguida de Empeltre, Ascolano y Liguria, todas para el mercado de aceitunas de mesa. La VII Región del Maule se caracteriza por tener una industria de aceite de oliva de importancia en la Comuna de Sagrada Familia, utilizando variedades aceiteras tales como Lección, Racimo y Frantoio. Las Regiones VIII y IX tienen en su mayoría olivos en formación, y no son más de 30 há.

I.1.1.1. EL ÁRBOL

El olivo (*Olea europaea L*) es un árbol perteneciente a la Familia botánica de las Oleáceas. Dentro de esa Familia es la única especie con fruto comestible (Figura I.1). Sus principales características

son: hojas verde oscuro brillante, blanquecinas por el envés, simples, de forma lanceolada y bordes enteros. Es un árbol perenne, sus hojas suelen vivir dos o tres años. La flor es pequeña. El tronco grueso y su corteza grisácea. El fruto es la aceituna color verde amarillento, cuya pulpa es oleosa una vez que ha llegado a la madurez. El hueso dentro del fruto encierra la semilla. El olivo se ramifica a escasa altura y sus ramas tienden a dispersarse. Requiere mucho sol y lo daña la excesiva humedad. Es un árbol centenario que comienza a producir fruto desde los tres años de edad. Su producción rentable comienza entre el séptimo y noveno año, y va incrementándose al aumentar su edad. Su productividad se estabiliza entre los 65 y 80 años de edad (López y col., 1999).



Figura I.1. Olivo

Este árbol está asociado a zonas de clima mediterráneo caracterizado por inviernos suaves y veranos cálidos, prácticamente sin lluvia. La

planta de olivo crece y fructifica apropiadamente entre las latitudes 30° a 45° hemisferio norte y 40° del hemisferio sur. Altitud ideal entre 250 y 500 metros sobre el nivel del mar. Temperatura ideal entre 35°C y -8°C. El crecimiento de los brotes inicia cuando los días llegan a tener varias horas a más de 21°C.

El olivo requiere acumulación de calor desde la floración hasta la maduración de las aceitunas, entendida ésta como cambio de color, desde un verde amarillento hasta el violáceo. El parámetro meteorológico más grave para los olivos es la humedad ambiental excesiva y permanente que favorece el desarrollo de enfermedades causadas por hongos, los cuales afectan principalmente durante el período de floración provocando la caída de flores. Los vientos secos y temperaturas elevadas durante la floración, ocasionan aborto ovárico generalizado, resintiéndose seriamente la producción. El olivo es un árbol ávido de luz, de forma que una deficiencia de ésta reduce la formación de flores o propicia que no sean viables. Los parámetros de precipitación pluvial para el olivo se encuentran entre 250 y 500 mm. anuales. Las horas de sol necesarias son alrededor de 2800 anuales (Izco, 2004).

I.1.1.2 HOJA

El olivo es un árbol perennifolio y las hojas sobreviven de 2 a 3 años en el árbol, aunque también pueden permanecer por más tiempo. Las hojas son simples, su forma es elíptica a lanceolada y presenta los bordes enteros. El limbo tiene una longitud de 3-9 cm y el ancho oscila de 1,0-1,8 cm. El nervio central es muy marcado frente a los secundarios. El pecíolo tiene una longitud que no supera los 0,5 cm. El haz de la hoja de olivo es generalmente de color verde-oscuro brillante

debido a la existencia de una cutícula gruesa que le permite adaptarse a períodos prolongados calurosos y con escasas precipitaciones. El envés está cubierto por abundantes pelos aparasolados que le confieren un color blanco-plateado (Barranco y col. 2004).

I.1.1.3. RAÍZ

La morfología de la raíz depende de cómo se haya originado el árbol y también del tipo de suelo. Si el árbol procede de semilla, durante los primeros años, se forma una raíz principal (pivotante) que domina el sistema radical dado que no se forman raíces laterales importantes. En cambio, si el árbol se ha producido por propagación vegetativa mediante enraizamiento de estacas semileñosas (método habitual en árboles comerciales), se forman múltiples raíces adventicias que se comportan en su mayoría como raíces principales en el árbol (Barranco y col. 2004).

Todas o muchas de estas raíces son como raíces principales múltiples. La profundidad y la extensión lateral del sistema radical y el grado de ramificación dependen del tipo y profundidad de suelo, aireación y contenido de agua del mismo. Las raíces más jóvenes son de color blanco y más activas en la absorción de agua y nutrientes minerales. Con el tiempo las raíces van envejeciendo tomando color marrón y perdiendo la actividad de absorción.

I.1.1.4 INFLORESCENCIA



Las inflorescencias (agrupación de flores) se desarrollan en las axilas foliares de los nudos del crecimiento vegetativo del año previo a la floración. Cada inflorescencia puede tener entre 10 y 40 flores según la forma de cultivo, condiciones fisiológicas y ambientales (Figura I.2)

Figura I.2.- Flores e inflorescencia

En las inflorescencias se presentan dos tipos de flores: perfectas y estaminíferas. Las flores perfectas son hermafroditas compuestas de estambres y pistilo bien desarrollados que luego darán lugar al fruto. Las estaminíferas o masculinas tienen el ovario rudimentario o ausente y consecuentemente no darán lugar a la formación del fruto. Su presencia, que puede llegar hasta el 50% en años normales, no suele reducir la producción (Barranco y col. 2004).

I.1.1.5 FLORES

Las flores son pequeñas con simetría regular. El cáliz es un pequeño tubo campanulado de color blanco verdoso que se mantiene junto a la base del ovario después de la caída de los pétalos. La corola está compuesta por cuatro pétalos blancos a blanco-amarillentos unidos a su base. Los estambres son dos y están unidos a la corola en orientación opuesta. Constan de un filamento corto y

una antera relativamente grande con numerosos granos de polen. En el centro de la flor se encuentra el pistilo compuesto por un ovario, un breve estilo y un estigma bilobulado (Barranco y col., 2004).

Alrededor de mayo o junio en España y entre noviembre y diciembre en Chile se da la formación de pequeñas flores blancas y verdes agrupados en forma de racimo. La polinización la facilita el viento; existen variedades autoincompatibles (que no fecundan solas) que necesitan la presencia de otra variedad que tenga una época de floración que coincida de modo bastante preciso para que pueda realizarse la polinización cruzada. También existe una variedad autocompatible cuyas flores pueden ser fecundadas por el propio polen que producen (Barranco y col., 2004).

En los primeros meses veraniegos se forman los primeros frutos verdes. Al final del verano e inicios del otoño y según la variedad, los frutos maduran y se transforman en las clásicas drupas de color negro morado. Los frutos de la aceituna no pueden ser consumidos tal cuál aparecen en el árbol: también las destinadas a la mesa son sometidas, después de la colección, a particulares tratamientos que las convierten en comestibles (Barranco y col. 2004).

I.1.1.6. FRUTO

La aceituna es el fruto del olivo, es de tamaño pequeño de forma elipsoidal a globosa según variedades. Es una pequeña drupa ovoide y muy amarga, de color verde amarillento o morado y con un hueso grande muy duro. Está formada por tres partes: la parte exterior (exocarpo o cáscara), la parte mediana (mesocarpo o pulpa) de la que se saca el 70% del aceite y la parte interna (endocarpo o avellano) del que se saca el restante 30% del aceite. La composición en general de la aceituna es la siguiente: agua (50%), aceite o materia grasa (18-25%), carbohidratos (20%), celulosa (6%), y proteínas (1,5%).

Existen muchos tipos y variedades de aceituna, tanto para el consumo en verde como para la producción de aceite. En España se contabilizan hasta 260 variedades, aunque las cinco más importantes por la superficie cultivada son las siguientes (Figura I.3)

Picual. Extraordinaria por su rendimiento graso, su rápida entrada en producción y su fácil mecanización durante la recolección. Mas del 50% del olivar español está constituido por esta variedad. Produce un aceite muy estable, siendo una planta muy susceptible a *Verticillium* (Barranco y col. 1994).

Arbequina. Muy buen rendimiento graso y muy buena calidad de aceite, aunque tiene el inconveniente de presentar frutos muy pequeños y ramos que transmiten muy mal la vibración durante la recolección. Como ventaja su porte arbustivo permite mayores densidades de plantación (Barranco y col. 1994).

Hojiblanca. Variedad de aceituna de tamaño aceptable, aunque mediocre tanto como para su consumo directo como por la calidad del aceite. Los árboles tienen alta tolerancia a suelos calizos; fruto de tamaño aceptable (Barranco y col. 1994).

Picudo. Variedad que vegeta muy bien y produce un aceite de excelente calidad, pero es muy sensible al "Repilo". Presenta un fruto grande que termina en un pezón que le hace merecedor de su

nombre, y que se dispone de forma asimétrica. También se caracteriza por la aparición de hojas bifidas u hojas dobles, aunque de forma general son ovaladas y de gran tamaño (Barranco y col. 1994).

Cornicabra o cornezuelo. De fruto muy alargado y asimétrico, se obtiene un elevado rendimiento graso con muy buena calidad de aceite. Presenta un muy mal comportamiento frente a las principales plagas y enfermedades (Barranco y col. 1994).



Figura I.3. Variedades de aceitunas mayoritarias en España

En Chile se contabilizan 12 variedades, siendo las más importantes, además de Arberquina y Picual, las siguientes (Figura I.4):

Frantoio. Su fruto de tamaño mediano y produce un aceite de mucha calidad organoléptica, muy frutal, de tonos verdosos y muy estable, rico en polifenoles.

Leccino: Es una variedad de fruto grande y de maduración muy pareja. Su aceite es bastante amargo y tiene un sabor muy fuerte.

Coratina: Su fruto es grande y produce un aceite de color muy amarillento. Gracias a su altísimo contenido de polifenoles generalmente se utiliza para enriquecer mezclas y no como monovarietal.



Figura I.4. Variedades de aceitunas mayoritarias en Chile

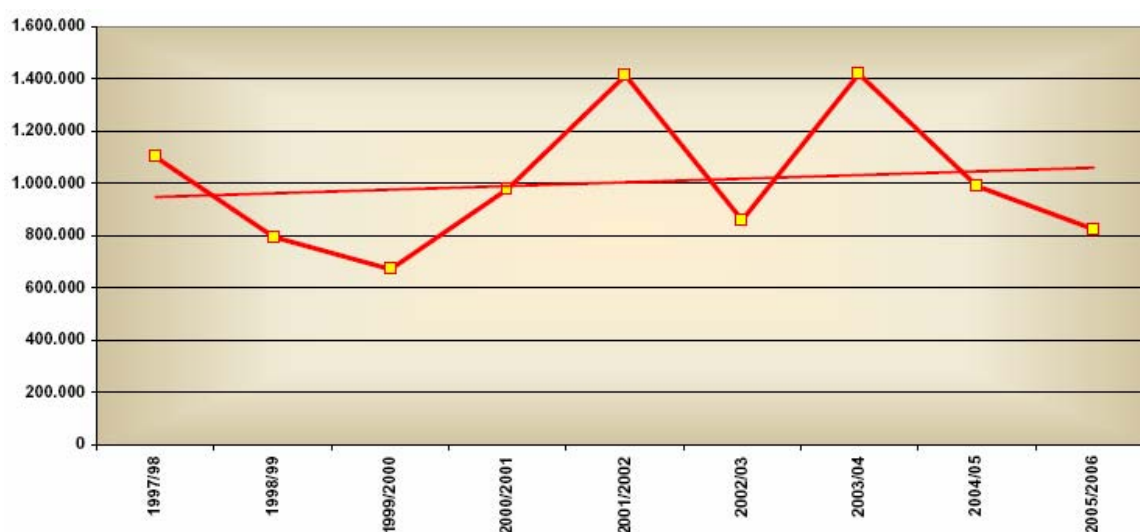
I.1.2. EL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva ha sido uno de los pilares básicos de la alimentación en las costas de Siria y Palestina, de Grecia, Italia, Dalmacia, África del Norte y la península Ibérica, el carácter sagrado que

llegó a alcanzar el aceite de oliva, se debió, no solo a su exquisitez como alimento, sino a sus múltiples utilidades. La primicia de la cosecha de aceitunas donde se obtenía el mejor aceite se reservaba para las ofrendas a los dioses, para las unciones sagradas y para los tratamientos de la medicina. Posteriormente, el cristianismo asumió al aceite de oliva, el trigo, el pescado, el vino y la sal como alimentos esenciales para la supervivencia y como símbolos religiosos (March y col., 1998). El florecimiento y expansión del cultivo del olivo en España parece deberse a la influencia de la civilización árabe, que utilizó el aceite de oliva como la grasa alimenticia por excelencia. El consumo del aceite de oliva forma parte, por tanto, de nuestro acervo gastronómico, sin olvidar que es la base económica fundamental de muchas comarcas españolas.

Durante décadas del siglo XX, el valor nutricional del aceite de oliva fue seriamente cuestionado, hasta el punto de que los expertos en nutrición desaconsejaron su consumo en favor de otros aceites vegetales como el de girasol y maíz. Sin embargo, estudios realizados demostraron que la tasa de muerte por enfermedades cardiovasculares en los países mediterráneos era inferior a la observada en otros países occidentales (Entrala, 1998). El motivo de estas diferencias parecía radicar en el tipo de alimentación mantenida por estas poblaciones, especialmente en lo referido a la calidad de la grasa consumida (Aparicio y col., 2003).

Por tal motivo, empezó a hablarse de la "Dieta Mediterránea", dieta caracterizada por un alto consumo de cereales, verduras, legumbres y fruta, poca carne y mucho pescado y con el aceite de oliva como grasa culinaria principal (Mata y col., 1993). Desde entonces numerosos trabajos han puesto de manifiesto las virtudes cardiosaludables de la "Dieta Mediterránea". El reconocimiento del valor nutritivo del aceite de oliva ha discurrido de forma paralela al estudio y conocimiento de las cualidades de este tipo de alimentación, tanto por el tipo de grasa mayoritaria en su composición, como por su contenido en sustancias antioxidantes.



Durante los últimos 10 años, la producción del aceite de oliva en España ha superado, como valor medio el millón de Toneladas por campaña, aunque en algunas de ellas la producción total ha sido

significativamente mayor (Figura I.5). En Chile, la producción es acusadamente menor alcanzando las 1500 Tm en el año 2004.

I.1.2.1. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA

Los sistemas de obtención del aceite de oliva han experimentado en las últimas décadas una profunda transformación dirigida fundamentalmente a mejorar los rendimientos y la productividad de la industria oleícola, obtener aceites de oliva de gran calidad, reducir los consumos de agua y energía y evitar en lo posible la generación de subproductos o residuos, algunos de los cuales presentan un elevado potencial contaminante. Estos cambios sobre todo se han circunscrito al método de extracción, pasando del tradicional sistema de molinos y prensas al sistema de centrifugación de 3 fases y posteriormente al de 2 fases, que prácticamente se encuentra generalizado en España (Espuny Rodriguez, 1997; Artacho del Pino, 1997).

Las etapas que configuran el proceso de elaboración de los aceites de oliva mediante el método de centrifugación en dos fases son (Figura 1.6): recolección y transporte, limpieza y lavado, control de peso, trituración de la aceituna, preparación de la

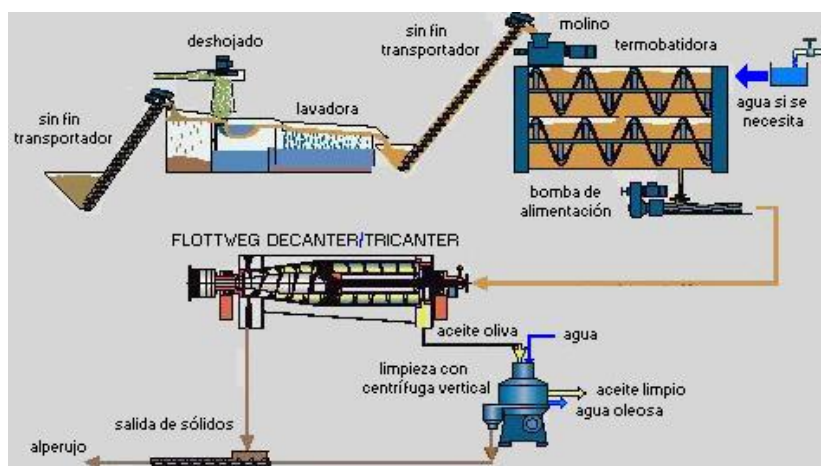


Figura I.6. Método de dos fases para la obtención de aceite de oliva (Alba, 1994; Alba *et al*, 1993)

pasta (termobatido), separación de la fase sólida, separación de la fase líquida,

almacenamiento y conservación del aceite (Alba, 1994; Alba *et al*, 1993). Está demostrada la influencia de las distintas etapas del proceso sobre la calidad del aceite obtenido, y por esta razón en este apartado se describirán en forma resumida cada una de ellas.

a) RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE

Al comienzo de la campaña de la aceituna el agricultor se encarga de recogerla y transportarla a la almazara. Con el fin de evitar al máximo la suciedad se debe separar la aceituna de vuelo (más abundante al principio de la campaña) de la de suelo. La aceituna de suelo suele estar sucia, atacada por plagas, etc., lo que le confiere un nivel de microorganismos tal que acelera la degeneración del aceite por catálisis enzimática; hidrolizando las grasas y aumentando su grado de acidez y enranciamiento. Toda la aceituna que entre en la almazara se debe procesar lo más rápido posible. No se debe amontonar si se requiere evitar fermentaciones y el atrojado del aceite (Aparicio *et al*, 2003).

b) LIMPIEZA

El proceso de limpieza de la aceituna tiene por objeto eliminar la tierra, ramas, hojas y piedras de los frutos recolectados. Para esto la aceituna pasa por una fuerte corriente de aire para eliminar las hojas y ramitas de poco peso, a continuación se pasa por una criba vibrante para quitar la tierra y por último las piedras (Aparicio *et al*, 2003).

c) LAVADO

Suele realizarse con agua en circuito cerrado. Sirve para eliminar impurezas solubles y pesadas (tierra, piedras) que reducirían el rendimiento y podrían deteriorar o averiar los equipos de procesado. La diferente densidad de la aceituna (flota) y la piedra hace que se separen fácilmente. Hay que tomar la precaución de mantener el agua lo más limpia para evitar la formación de lodos. En este proceso se debe evitar el lavado conjunto de aceituna procedente del árbol con la misma agua que la procedente del suelo (Aparicio *et al*, 2003).

La aceituna que llega limpia a la almazara no se debe lavar (aunque pudiera limpiarse de hojas, etc), ya que cuando la aceituna se lava, el agua que queda adherida a ella puede provocar la formación de emulsiones que dificultan la separación del aceite. Por otro lado esta agua es la responsable de que el aceite tenga menor contenido en polifenoles con lo que afectará a la estabilidad del aceite así como grado de afruitamiento.

d) CONTROL DE PESO

Las aceitunas limpias se introducen en una tolva de pesada con el objeto de registrar la masa de éstas. También aquí se recogen las muestras para determinar el rendimiento graso (Aparicio *et al*, 2003).

e) TRITURACIÓN DE LA ACEITUNA

El objetivo es romper y dividir el fruto y formar una masa compuesta por pulpa (con alto contenido en aceite en sus tejidos), hueso, piel (exocarpio) y una pequeña proporción de aceite libre. Mediante la molienda se produce la rotura de los tejidos de la aceituna donde se aloja la materia oleosa, poniendo ésta en disposición de agruparse y de ser fácil de separar por métodos exclusivamente mecánicos.

Actualmente, entre los métodos más utilizados, destaca el triturador de martillos para molturar la aceituna y así liberar su aceite alojado como pequeñas gotitas. Consiste en unas palas en forma de martillo que giran a gran velocidad haciendo pasar la pasta formada a través de una malla o tamiz (Aparicio *et al*, 2003).

f) PREPARACIÓN DE LA PASTA (Termobatido)

Con esta etapa se persigue concentrar el mayor número posible de gotas y microgotas de aceite ocluidas en la masa, para facilitar y aumentar el rendimiento graso. Para ello se utilizan

termobatidoras horizontales (Figura I.7) con diferentes diseños de rotores, paletas y cortadores de corriente que proporcionan a la masa de aceitunas trituradas una agitación continua.

El aumento de la temperatura reduce la viscosidad del aceite y mejora la extractabilidad de la pasta. Para evitar procesos oxidativos y disminuir la viscosidad, mediante unas espas, la pasta de aceituna se somete a un movimiento lento a una temperatura de entre 25-30°C durante un tiempo de 75 minutos aproximadamente. Si es necesario en esta etapa se agrega hasta un 10% de agua (Hermoso et al., 1999). Es muy importante mantener la temperatura en el intervalo que antes hemos citado ya que a temperaturas mayores se descomponen antioxidantes como la vitamina E y pierden compuestos volátiles responsables del aroma (Vilar *et al*, 2003).



Figura I.7. Termobatidor horizontal (Hermoso et al., 1999).

g) SEPARACIÓN DE LA FASE SÓLIDA (Decanter)

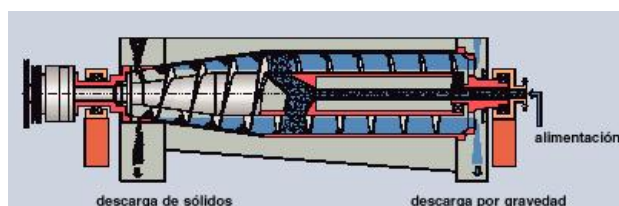


Figura 1.8. Decanter dos fases

Aunque, por si solas, cada una de las etapas son muy importantes, es ésta la que se responsabiliza de la extracción en si. Se realiza con el decantador centrífugo horizontal (decánter). No es más que un rotor cilindricocónico giratorio y un rascador helicoidal de eje hueco que gira coaxialmente en el interior del mismo (Figura 1.8) y a diferente velocidad que él. Una vez en el decánter los componentes más pesados (sólidos y agua) se aproximarán a las paredes debido a la fuerza centrífuga, donde un sinfín los irá retirando y expulsando al exterior. A esta masa de desecho se le denomina orujo, orujo húmedo o alpeorujo. La fracción menos densa (el aceite) quedará en las zonas menos alejadas del eje de giro siendo expulsada al exterior. El ritmo óptimo de inyección en el decánter está entre el 65 y 70% de su capacidad teórica (Espínola *et al*, 1995; Aragón *et al*, 2000).

h) SEPARACIÓN DE LA FASE LÍQUIDA (Centrifugación)

El aceite que se obtiene en el decánter tiene restos de agua (aprox. 2%) y sólidos en suspensión (aprox. 0,5%). Para eliminarlos se le adiciona entre 30-40% de agua a 35-40°C y se centrifuga. El aceite que se obtiene se almacena en la bodega en depósitos de acero inoxidable o recubiertos de resinas epoxi. En lugar de tener pocos depósitos de gran capacidad se aconseja tener varios más pequeños con el objeto de clasificar el aceite en varias calidades conforme va avanzando la campaña. El aceite obtenido antes, será de mejor calidad con menor acidez (mayoría de aceituna de vuelo), más verde (clorofila) y amargo (mayor contenido en polifenoles que retrasan la oxidación).

i) ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DEL ACEITE

El almacén o bodega (Figura I.9) es el lugar donde el aceite va a permanecer hasta su comercialización. Las características que debe reunir una buena bodega son las siguientes:



Figura I.9. Bodega

- paredes y techos aislantes
- temperatura uniforme, entre 15-18 °C, que permita una maduración de los aceites sin favorecer la oxidación
- disponer de un sistema de calefacción
- no aportar olores extraños
- poca luminosidad
- fácilmente limpiable.

El material de construcción de los depósitos debe ser inerte. Entre los materiales que cumplen estos requisitos se encuentran: el azulejo vitrificado, el acero inoxidable, el poliéster-fibra de vidrio. En ningún caso el hierro ni cobre, ya que son catalizadores de la oxidación (Vilar *et al*, 2003). Los depósitos no deben tener en general, un tamaño superior a 50 Tm. para poder realizar una diferenciación de calidades. Deben tener el fondo cónico

para realizar un buen sangrado, ya que los aceites pasan a la bodega con cierta humedad e impurezas, estas precipitan, fermentan y aportan a los aceites olores y sabores anómalos.

I.1.2.2 COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

Desde un punto de vista químico, los componentes del aceite de oliva suelen dividirse en una fracción saponificable (aquella que se transforma en jabones cuando se trata con un hidróxido alcalino) y en otra fracción insaponificable. La primera, que constituye el 97-99 % del total del aceite, está integrada mayoritariamente por triglicéridos y una pequeña proporción de ácidos grasos libres, responsables del grado de acidez del aceite. La segunda la componen una serie de sustancias muy diversas no glicéridas, denominadas componentes menores o secundarios del aceite de oliva. Si bien la proporción de estos últimos elementos en el aceite es muy minoritaria (1-3 %), revisten una gran importancia tanto desde el punto de vista nutricional como en la estabilidad y calidad organoléptica del aceite. De hecho, debido a su alta especificidad, los componentes secundarios se utilizan como criterio de calidad y autenticidad del aceite de oliva (Aparicio y col., 2003).

I.1.2.2.1. TRIGLICÉRIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

Los triglicéridos son los constituyentes principales de todos los aceites y grasas conocidas. Son sustancias con un alto contenido energético, ya que aportan 9 kcal/g y básicamente desempeñan una función de almacenamiento o reservorio energético. Están formados por una molécula de glicerol esterificada con ácidos grasos y sus propiedades biológicas vendrán definidas por el tipo de ácido graso que contengan en su composición (Primo, 1997).

Los ácidos grasos son compuestos hidrocarbonados con un grupo metilo terminal y un grupo carboxilo. Los más significativos desde el punto de vista biológico son aquellos que contienen un número par de átomos de carbonos y pueden clasificarse de acuerdo al número carbonos o en función del grado de saturación de sus enlaces. De este modo, podemos hablar de ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos), de ácidos grasos de cadena media (8-12 carbonos), de ácidos grasos de cadena larga (14-18 carbonos) y de ácidos grasos de cadena muy larga (mayor de 20 carbonos).

Por otra parte, y atendiendo al grado de saturación, los ácidos grasos se clasifican en:

- Ácidos grasos saturados, que son aquellos que no presentan ningún doble enlace en su cadena. Su procedencia es fundamentalmente animal, aunque algunos aceites vegetales como los de coco y palma los contienen de manera significativa. Desde hace décadas es conocido el papel aterogénico de este tipo de grasa (OMS, 1990; Entrala, 1998).
- Ácidos grasos monoinsaturados, que poseen un único doble enlace en su cadena y se encuentra mayoritariamente en productos vegetales. El ácido graso monoinsaturado más abundante, representativo y con unos efectos más evidentes sobre la salud es el ácido oleico, componente mayoritario del aceite de oliva y presente también en frutos secos y otros aceites de semillas. El efecto cardiosaludable de los ácidos grasos monoinsaturados es asimismo de sobra conocido, ya que pueden tener una acción beneficiosa sobre el perfil lipídico, antitrombogénica y antioxidante (Pocoví y col., 1998).
- Ácidos grasos poliinsaturados, que presentan más de un doble enlace y, como en el caso anterior, pueden tener efectos antitrombogénicos e hipolipemiantes (Pocoví y col., 1998; Mata y col., 1993).

Cada tipo de ácido graso presenta unas propiedades características que van a condicionar tanto las cualidades físico-químicas de la grasa como su actividad biológica. De este modo, las grasas con predominio de ácidos grasos insaturados son líquidas a temperatura ambiente, por lo que comúnmente se denominan aceites. Por el contrario, las grasas con un 30-80 % de ácidos grasos saturados son sólidas y constituyen los sebos y mantecas animales y algunas vegetales (Primo, 1997). Por otra parte, los enlaces simples se configuran en posición *trans*, en tanto que los enlaces dobles lo hacen, en la mayoría de las grasas naturales, en posición *cis*. Esto origina una conformación espacial de la molécula diferente, lo que conlleva importantes repercusiones en la actividad biológica de las grasas que los contienen.

El aceite de oliva está compuesto en un 97-99 % por triglicéridos y ácidos grasos libres. El ácido graso mayoritario es el ácido oleico, constituyente del 55-83% del contenido en ácidos grasos (Jiménez y col., 2001). Le siguen los ácidos grasos saturados que, en conjunto, suponen entre un 13 y un 21 %. El ácido más representativo es el ácido palmítico cuya presencia en el aceite de oliva varía

entre el 11 y el 20 % de total de contenido graso. En menor proporción encontramos el ácido esteárico, con valores que oscilan entre el 1 y el 3 % (Jiménez y col., 2001).

Por último, la cantidad menor de ácidos grasos corresponde a los poliinsaturados, principalmente el ácido linoleico con un 4,5-22%. En mínima proporción contiene ácido linolénico que, según la norma del CODEX para los aceites de oliva, no debe superar el 1,5 %, pero que según el reglamento comunitario debe ser inferior al 0,9 % (Diario Oficial CEE, 1991).

El contenido de ácidos grasos del aceite de oliva difiere significativamente en función de la variedad de aceituna cultivada. Otros factores que pueden modificar cualitativamente el contenido graso del aceite son la latitud, condiciones agroclimáticas y grado de madurez en la recolección de la aceituna (Boskou, 1998). Por

Tabla I.1. Contenido de ácidos grasos en el aceite de oliva

Acido Graso	N° Carbonos	Porcentaje
Mirístico	C14:0	< 0.05
Palmítico	C16:0	7-18
Palmitoleico	C16:1	0,3-3
Esteárico	C18:0	0,5-5
Oleico	C18:1	61-83
Linoleico	C18:2	2-18
Linolénico	C18:3	< 1,5
Aráquico	C20.0	< 0,5

el contrario, los procesos de refinado no alteran de forma significativa el contenido en ácidos grasos. En Tabla I.1 se representa el contenido en los diferentes ácidos grasos (expresado en porcentaje del total de ácidos grasos) en las distintas variedades más comunes en nuestro país (Uceda, 2000). Durante el proceso de refinado, el contenido de ácidos grasos no se ve alterado notablemente, aunque pueden detectarse pérdidas de ácidos grasos poliinsaturados y, consecuentemente, un incremento en la proporción de la concentración de saturados y oleico (Bonilla y col., 1997).

I.1.2.2.2. FRACCIÓN INSAPONIFICABLE

Resulta enormemente difícil determinar todos los componentes menores del aceite de oliva debido a su complejidad y a su baja concentración en el mismo. La fracción insaponificable del aceite se obtiene tras la saponificación con un hidróxido alcalino y la extracción con un disolvente. De este modo, los constituyentes menores pueden dividirse en dos grupos: un primer grupo de sustancias derivadas de ácidos grasos como ceras, ésteres de esteroides, fosfátidos, monoglicéridos y diglicéridos. El segundo grupo lo conforman compuestos no relacionados químicamente con los ácidos grasos como hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides, tocoferoles, carotenoides, clorofilas y compuestos fenólicos (Boskou, 1998). Los procesos de refinado reducen considerablemente la cantidad de materia insaponificable, por lo que, si bien no afecta su contenido energético, sí altera notablemente su valor biológico y calidad nutritiva.

La acción biológica de algunas de estas sustancias es variable y en los últimos años muchos estudios concentran su atención en los efectos beneficiosos de las mismas sobre la salud, por su posible actividad antioxidante, hipolipémica o antiaterogénica. (Calabresse, 2002; Murcia y col., 2003;

Stampfer y col., 1995; Jones y col., 1997). Otras, por el contrario, contribuyen a la estabilidad del aceite y a sus propiedades organolépticas pero no presentan una actividad fisiológica destacable. Por ello, y debido a la enorme complejidad y variedad de los componentes minoritarios del aceite, solo se abordarán aquellos que revistan una especial importancia desde una perspectiva nutricional.

I.1.2.2.3. HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos constituyen el 32-50 % de la fracción insaponificable (Jiménez y col., 2001). El principal hidrocarburo presente en el aceite de oliva es el escualeno, un compuesto de 30 átomos de carbono, producto intermedio de la biosíntesis de colesterol y precursor de los triterpenos. También es precursor del cicloartenol, sustancia a partir de la cual se sintetizan los fitoesteroles. (Azcón-Bieto y col., 2000). Su presencia en la materia insaponificable puede llegar a alcanzar el 40% de la masa total (Boskou, 1998), lo que se traduce en 125-750 mg por cada 100 g de aceite de oliva virgen (Smith, 2000).

El β -caroteno es otro hidrocarburo tetraterpénico presente en el aceite de oliva. Junto con la clorofila, es el responsable de la coloración verde-amarillenta del aceite virgen. La concentración de β -caroteno en el aceite de oliva es muy bajo y oscila, según los autores, en torno a 0.03-0.5 mg/100 g (Jiménez y col., 2001).

Se han identificado otros hidrocarburos presentes en el aceite como hidrocarburos aromáticos, policíclicos, de cadena ramificada, etc. que contribuyen a conferir sabor y aroma al aceite.

I.1.2.2.4. TOCOFEROLES

El más importante es el alfa-tocoferol o Vitamina E (150-300ppm). Los tocoferoles son antioxidantes que contribuyen a dar estabilidad al aceite. El tocoferol mayoritario es el α -tocoferol, que supone el 95% del total de los tocoferoles y el más activo biológicamente como vitamina E. El 5% restante lo constituyen el β -tocoferol y γ -tocoferol que poseen un marcado efecto antioxidante.

En la elaboración del aceite de oliva virgen, es muy importante mantener la temperatura por debajo de los 35°C en la etapa de termobatido ya que por encima de esta temperatura la Vitamina E se descompone eliminando del aceite uno de sus antioxidantes más importantes.

La concentración de tocoferoles en el aceite de oliva varía de manera significativa en función de diversos factores como la variedad de la aceituna, grado de madurez en el momento de la recolección y condiciones y duración del almacenamiento. Por ello, se han reportado diversas cifras en el contenido de tocoferoles del aceite de oliva virgen que varían como promedio entre 150-200 mg/kg (Jiménez y col., 2001), aunque algunos autores han reportado cifras superiores de hasta 240-430 mg/kg (Smith, 2000; Owen, Mier y col., 2000). En la figura se representa el contenido total de tocoferoles en diversos aceites de oliva vírgenes procedentes de algunas de las variedades españolas más representativas cultivadas en diferentes zonas (Uceda, 2000).

I.1.2.2.5 FITOESTEROLES

Son compuestos derivados del escualeno cuya característica común es la presencia del anillo esterol y las diferencias radican en la cadena lateral. Su función principal es estructural, ya que son constituyentes de las membranas celulares vegetales, aunque algunos fitoesteroles presentan también una cierta acción hormonal (Azcón-Bieto y col., 2000). Estos componentes están relacionados con la calidad del aceite de oliva, pero fisiológicamente su importancia radica en su capacidad hipolipemiente ya que interfiere competitivamente en la absorción intestinal del colesterol dietético (Jones y col., 1997).

Se han identificado más de 40 fitoesteroles y su concentración en el aceite de oliva oscila, según los autores, entre 80 y 265 mg/100 g (Jiménez y col., 2001). El fitoesterol más abundante es el beta-sitosterol, que constituye el 90-95 % del total de los esteroides vegetales del aceite. En menor proporción se encuentran el campesterol (3%) y estigmasterol (1%). La concentración de fitoesteroles puede variar dependiendo del grado de maduración de la aceituna en el momento de la recogida (Gutiérrez y col., 1999).

I.1.2.2.6 COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo bencénico, con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (Tsimidou, 1998).

La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Shahidi y Naczk, 1995).

Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional (Harborne, 1989):

•Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos

Dentro de este grupo los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales

como el gálico, vainillínico, hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el contrario existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en los vegetales (Belitz y Grosch, 1988).

•**Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles**

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico (Belitz y Grosch, 1988). Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido (Belitz y Grosch, 1988), mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio (Bravo, 1998).

•**Lignanos y neolignanos**

Son metabolitos de las plantas de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno (Chesson y col, 1997). El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano.

•**Flavonoides**

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos (Harborne, 1993), siendo los polifenoles más distribuidos en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanololes, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandioli y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos estos grupos las flavonas (p.e. apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (p.e. quercitina, mirecitina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales (Hertog y col, 1993).

•**Taninos**

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales (1 a 2 por 100 D), siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas. Estos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados. Los taninos condensados tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa, y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidroxidifenico, formando los galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Tras la hidrólisis con ácidos, bases o ciertas enzimas, los galotaninos dan glucosa y ácido gálico (Chung K-T y col, 1998).

Los polifenoles hidrosolubles se encuentran mayoritariamente presentes en la pulpa de la aceituna, aunque en el aceite se pueden encontrar pequeñas cantidades de estos elementos. El grupo de compuestos fenólicos identificados en el aceite de oliva virgen abarca un elevado número de sustancias como ácido gálico, ácido cumárico, ácido vainíllico, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido elenólico, tirosol e hidroxitirosol.

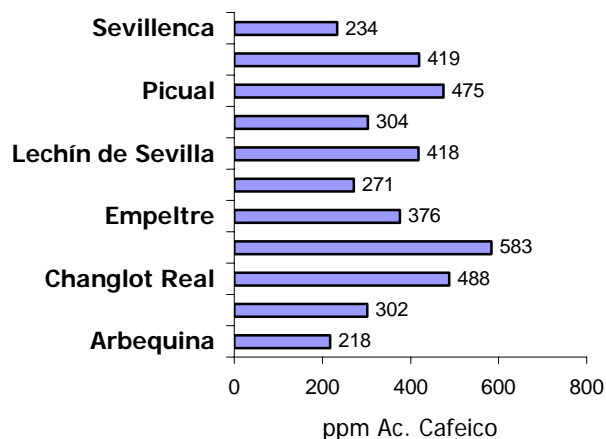


Figura I.10. Contenido de polifenoles en distintas variedades de aceite de oliva (Uceda, 2000)

Por término medio, el aceite de oliva contiene 50-800 mg/kg de polifenoles totales expresados en forma de ácido caféico (Jiménez y col., 2001). Su concentración varía enormemente en función de numerosos factores como la variedad (Figura I.10) y grado de maduración de la aceituna y el sistema de elaboración, ya que al ser compuestos hidrosolubles pueden perderse con facilidad.

I.1.3. EL ALPERUJO

El alperujo es el principal residuo sólido que se genera durante el proceso de elaboración del aceite de oliva por el sistema de centrifugación por 2 fases. Aproximadamente un 80% de la aceituna molturada se transforma en este residuo orgánico y por ello en la campaña 2003/04 se estima que la producción de alperujo superó las cinco millones y media de toneladas. Además del alperujo, el proceso de centrifugación por dos fases genera otros tipos de residuos:



Figura I.11. Alperujo

- Hojín. Se genera durante la limpieza de las aceitunas en las almazaras. Pueden ser utilizados en alimentación animal o como materiales estructurantes en procesos de compostaje y vermicompostaje.
- Aguas de lavado de aceitunas, de lavado de aceite y de la limpieza de almazaras pueden ser utilizadas en riego, aunque para ello deben ajustarse en su composición a una serie de valores y cumplir el requisito de aviso previo y una limitación al esparcimiento en el terreno de 30 m³ ha⁻¹ cada siete días. Estas aguas no deben superar los siguientes parámetros: pH: 6-9; Sólidos en suspensión: 600 mg kg⁻¹, DBO: 2000 mg kg⁻¹ y DQO: 2500 mg kg⁻¹ (Martínez Nieto y col., 2003).

El alperujo es un residuo sólido lignocelulósico, de naturaleza recalcitrante. Posee una humedad comprendida entre un 55 y 75%, con partículas de tamaño pequeño, escasa porosidad, lo que le da una consistencia plástica y susceptible a la compactación. Su pH es ácido entre 5 y 6. El alperujo presenta un escaso contenido de nitrógeno ($8-17 \text{ g kg}^{-1}$) y fósforo ($0,8 \text{ y } 2 \text{ g kg}^{-1}$). En cambio la concentración de potasio es elevada ($8-30 \text{ g kg}^{-1}$), al igual que ocurre con la mayoría de los residuos de olivar (Romero y col., 2005). Las concentraciones de micronutrientes suelen ser bajas, y por lo general inferiores a la de otros residuos orgánicos.

El alperujo contiene elevados valores de carbono orgánico total ($500-600 \text{ g kg}^{-1}$). La materia orgánica ($900-950 \text{ g kg}^{-1}$) de este residuo está constituida mayoritariamente por lignina ($323-556 \text{ g kg}^{-1}$), celulosa ($140-250 \text{ g kg}^{-1}$) y hemicelulosa ($273-415 \text{ g kg}^{-1}$). Otros constituyentes orgánicos importantes son las grasas ($77-194 \text{ g kg}^{-1}$), carbohidratos solubles ($13-164 \text{ g kg}^{-1}$) y proteínas ($44-115 \text{ g kg}^{-1}$) (Alburquerque y col., 2004). Además de ello, es un material con elevado potencial fitotóxico y antimicrobiano debido fundamentalmente a su gran contenido en polifenoles ($7-24 \text{ g kg}^{-1}$) (Benitez y col., 2005).

El alperujo suele ser transportado a las orujeras, en las que era sometido a una extracción con solventes (por lo general hexano) con el objeto de extraer el denominado "aceite de orujo" quedando al final del proceso un nuevo residuo con un contenido de humedad inferior al 18%. Genéricamente este residuo recibe la denominación de orujo seco y extractado u orujillo. Los orujillos han sido utilizados tradicionalmente como combustible de las propias orujeras, aunque en los últimos años se ha realizado un notable esfuerzo para utilizarlos como enmiendas orgánicas del suelo previa transformación mediante compostaje y vermicompostaje (Benitez y col., 2002; Moreno y col., 2000; Nogales y col., 1998,99b).

Sin embargo, en los últimos años la industria de la extracción del aceite de orujo se encuentra con graves problemas que han provocado el cierre de la mayoría de las orujeras existentes en Andalucía y resto de España. Estos problemas pueden resumirse en los siguientes hechos: a) el bajo coste del aceite de oliva virgen o refinado que ha motivado el descenso en el consumo de aceite de orujo de oliva, b) la dificultad del secado previo del alperujo, el cual se camareliza en los hornos, impidiendo la penetración del solvente que crearía bolsas de hexano con el consiguiente riesgo de explosión, c) la elevada temperatura necesaria para secar el alperujo que deteriora la calidad de aceite de orujo extraído (Pina, 1997), d) la exigencia de un contenido máximo de 2 ppb de benzopirenos en el aceite de orujo exigidas por las autoridades sanitarias de nuestro país. Por tales motivos la posible reutilización del alperujo para la obtención del aceite de orujo tiende a desaparecer en un futuro próximo, a no ser que las autoridades pertinentes ayuden al sector (Pina, 1997).

Además del uso del alperujo como materia prima para la extracción del aceite de orujo, puede ser incorporado al suelo, aunque su aplicación directa debería ser prohibida debido al elevado potencial fitotóxico que presenta este material. Por ello, y antes de su uso agrícola es imprescindible que este material sea sometido a procesos de biotransformación y estabilización que posibiliten la obtención de enmiendas orgánicas que tengan efectos positivos sobre los suelos y cultivos vegetales. Para ello se han ensayado procesos de compostaje, y en menor medida de vermicompostaje, utilizando este

residuo mezclado con otros como hojín, estiercoles de diferente naturaleza, lodos de depuradora, etc.. (Cegarra y col., 2000, Benitez y col. 2002). Aparte de esta vía de reutilización de este residuo, en los últimos un gran interés han suscitado las siguientes:

a) Aprovechamiento del alperujos como fuente de proteínas para alimentación animal (Martín y col., 2003; Molina y col., 2003).

b) Reutilización del alperujo como biocombustible en plantas de cogeneración de energía térmica y eléctrica (actualmente existen nueve plantas en la comunidad autónoma andaluza). Estos sistemas originan beneficios para las almazaras y empresas oleícolas por la venta del excedente de energía y por las ayudas que concede tanto la Junta de Andalucía como el gobierno central. Presenta la ventaja de necesitar poco terreno para su implantación, y reduce el peso de los alperujos en un 70% y el volumen en un 80-90%. Sin embargo, genera una gran cantidad de cenizas, las cuales son abandonadas en vertederos adyacentes, sin haberse encontrado vías de reutilización de las mismas. Recientemente se ha demostrado que estas cenizas pueden ser utilizadas como fertilizantes debido a su elevada capacidad para suministrar P y K al suelo y la planta (Nogales y col.,2006a).

c) Separación de los componentes del alperujo en pulpa + piel, huesos triturados de aceituna y alpechín concentrado. Parte de los huesos triturados se utilizan para la obtención de carbón activo, que se lleva a cabo en la empresa Ibérica de carbones Activos S.A., empresa participada mayoritariamente por Oleícola El Tejar. El resto de los huesos pueden ser utilizados para otros fines. La pulpa + piel y el alpechín están siendo investigados como materiales para otros usos.

I.2. HONGOS: *Pleurotus ostreatus*



I.2.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos pluricelulares, rara vez unicelulares, formados por células eucariotas y en general carentes de cilios, flagelos y clorofila, de forma filamentosa o levaduriforme, siendo su característica, como organismos pluricelulares, el que su célula sea alargada (*hifa*), rodeada ésta por una pared celular constituida por quitina, un polisacárido complejo aminado presente también en el esqueleto externo de los insectos y crustáceos, que le da rigidez. Por su parte, la forma levaduriforme, características de los hongos unicelulares, se distingue porque su pared celular contiene menor proporción de quitina combinada con otros compuestos, como los glucanos (formados por glucosa condensada como la celulosa, el almidón y el glucógeno) y las glucoproteínas, que favorecen la forma esférica o redondeada. (Curtis,1991)



Figura I.12.- Tipos de hifas

La célula filamentosa, originada a partir de una espora, en su inicio presenta crecimiento por un extremo, detrás del cual suele ramificarse llegando a formar una intrincada red de hifas (Micelio).

Las hifas presentan paredes transversales (septos o septum), (Figura I.12) que pueden o no ser completos, observándose en ellos un poro (poro septal), que favorece la circulación de materiales. Este poro o septo, se cierra cuando porciones del micelio se separan para desempeñar funciones específicas como la esporulación o bien cuando la célula envejece o sufre algún daño. El núcleo presente en las hifas en la mayoría de las especies es haploide.

En las hifas apicales, localizadas al extremo de cada ramificación, pueden presentar hasta dos núcleos, condición que recibe el nombre de dicarionte, característica que también presentan algunas especies de hifas al momento de reproducirse. En las hifas posteriores, el número de núcleos se puede reducir a uno, que se desplaza de una célula a otra a través de los septos, en especies con hifas septadas. En los hongos que no presentan hifas septadas, los núcleos se distribuyen a lo largo del filamento, lo cual les da una apariencia multinucleada o cenocítica.

Se ha señalado que la intrincada red de hifas o micelio no representa un verdadero tejido; el micelio que penetra en el sustrato y que interviene en los mecanismos de nutrición y crecimiento del hongo, es el micelio vegetativo, mientras que la sección que participa en los procesos de reproducción corporal general y que carece de raíz, tallo y hojas, como estructuras diferenciadas es el talo.

La forma de la célula levaduriforme nunca produce micelios; sin embargo, algunas especies de hongos, de acuerdo con las condiciones ambientales pueden presentar tanto la forma levaduriforme como la filamentosa, en que se denomina dimórficas.

El micelio extendido por el sustrato constituye una colonia y se puede apreciar como una malla floja de hifas, en el caso de los mohos, o bien de forma muy compacta como un cuerpo fructífero como en los hongos superiores. Esta disposición del micelio, así como sus estructuras reproductoras, el tipo de

esporas, las ornamentaciones y la coloración que presentan se emplean en las tareas de clasificación de las diversas especies de hongos que hay en la naturaleza.

I.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS

La clasificación de los hongos es un tema de extraordinaria complejidad. Se establece una propuesta de cinco Reinos (Margulis, 1985): *Animalia* (animales y organismos móviles multicelulares que se alimentan heterotróficamente), *Plantae* (vegetales y organismos multicelulares que se alimentan por fotosíntesis), *Protista* (protozoos y algas unicelulares), *Monera* (bacterias a algas azules-verdes), y *Hongos*.

Existen diversas clasificaciones de los hongos, pero se utilizará la de Alexopoulos & Mims (1987), modificado, que aparece la más adecuada para presentar este trabajo de tesis doctoral. El Reino de los hongos se subdivide en tres divisiones: *Gymnomycota*, *Mastigomycota* y *Amastigomycota* (Figura I.13). Esta última división *Amastigomycota* se subdivide a su vez en *Ascomycota* (el más extenso grupo de hongos que comprende el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos) *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Chytridiomycota* y *Deuteromycota*. A su vez y según su reproducción sexual se subdividen en cinco clases: *Chytridiomycetes* con reproducción por conjugación planogamética, micelio no dicariótico y zoosporas, *Zygomycetes* con reproducción gametangial, micelio no dicariótico y zigosporas, *Ascomycetes* con reproducción somatogámica, micelio dicariótico conservado por el crozier y ascosporas, *Basidiomycetes* con reproducción somatogámica, micelio dicariótico conservado por pinzas de conexión y basidiosporas, Hongos Imperfectos (*Deuteromycetes*) carentes de reproducción sexual conocida (Prescott, 1999).

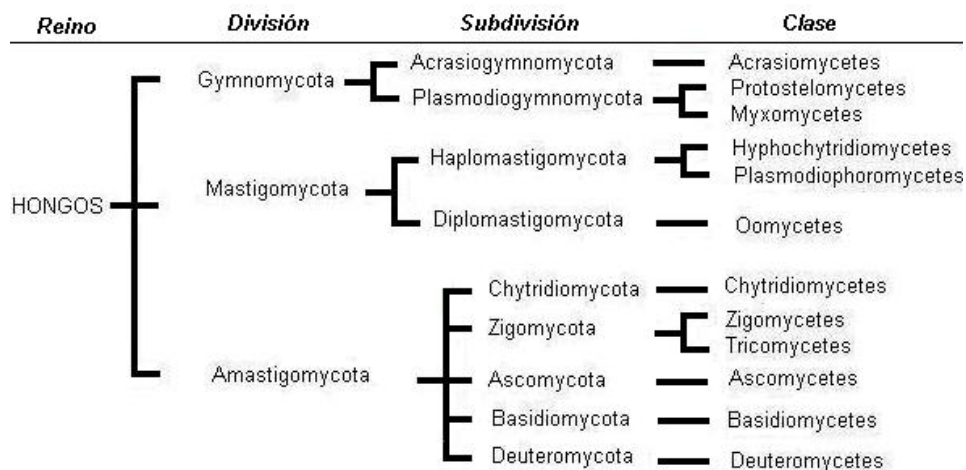


Figura I.13. - Clasificación del Reino Hongos según Alexopoulos y Mims (1987)

I.2.2.1. SUBDIVISIÓN CHYTRIDIOMYCOTA

Entre los hongos más pequeños y más simples, se encuentran los chytrids, término usado para referirse a aquellos hongos *chytridiales*, que se desarrollan en ambientes acuáticos o semi-acuáticos,

tales como océanos, lagos, ríos, e incluso suelo húmedo. Son parásitos o descomponedores de otros microorganismos y por ello se les considera microorganismos importantes del ambiente acuático. Tienen esporas flageladas (zoosporas) para propulsarse en el agua y quitina para reforzar las paredes sus celulares (Prescott, 1999). Son un grupo único entre los hongos al tener celulosa, el principal componente de las paredes celulares de las plantas.

I.2.2.2. SUBDIVISIÓN ZYGOMYCOTA

Las clasificaciones tradicionales establecen que la Subdivisión Zygomycota se compone de las Clases *Zygomycetes* y *Trichiomycetes* y al interior de la primera de estas Clases, *Zygomycetes*, se han clasificado lo Órdenes Mucorales, Dimargaritales (en otros casos se encuentra como Dimargantales), Zoopagales, Entomophthorales, y Endogonales (Margulis y Schwartz, 1985).

Los miembros de este grupo poseen micelio cenocítico (sin paredes que separen los núcleos en células) carente de septas, salvo para la separación entre las estructuras reproductoras y el resto del micelio. Muchos de ellos son saprotróficos y se alimentan osmotróficamente de material vegetal en descomposición. Algunos otros son altamente especializados y viven sobre animales, plantas, protocistos y hongos.

I.2.2.3. SUBDIVISIÓN ASCOMYCOTA

La Clase Ascomycetes que constituye esta Subdivisión es la más numerosa de los hongos perfectos, conociéndose aproximadamente unas 15.000 especies (Spatafora y Blackwell, 1993; Spatafora, 1995). Como es de esperar en un grupo tan grande existe una notable variedad de formas y estructuras. En un extremo de la escala se hallan los microorganismos unicelulares que se conocen corrientemente con el nombre de levadura y en el otro, especies como las trufas, con gran desarrollo micelar y refinadas estructuras reproductoras (Taylor y col, 1993).

Los *Ascomycetes* están caracterizados por la presencia en su ciclo de vida (Figura I.14), de un célula fértil, llamada célula ascógena denominada asco (estructura en forma de saco o bolsa que contiene esporas de origen sexual) que producirá endógenamente 8 ascosporas típicamente. Esta célula ascógena proviene de un ascogonio y en general esta dispuesta en una capa de células similares y en estructuras características denominadas cleistotecio, peritecio o apotecio.

Los hongos representantes de este grupo se

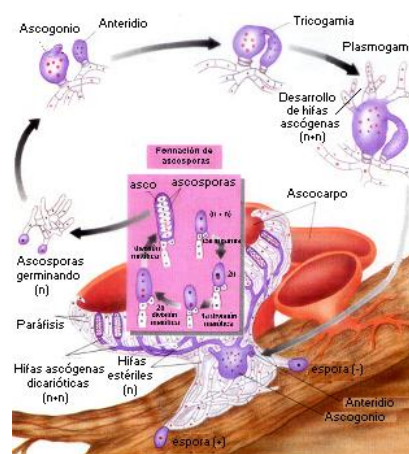


Figura I.14. Ciclo de vida de Ascomycetes

encuentran prácticamente poblando todo tipo de hábitat, y pueden presentar cualquier tipo de nutrición, esto es, saprobios, parásitos o simbioses.

I.2.2.4. SUBDIVISIÓN DEUTEROMYCOTA

La Subdivisión Deuteromycota es una división clásica que agrupa a aquellos hongos que carecen de una reproducción sexual u hongos en los que la reproducción sexual no se ha observado (Prescott, 1999) debido a los siguientes hechos:

- Evolutivamente van perdiendo la capacidad de reproducirse sexualmente
- No han alcanzado cierto nivel de evolución
- Para la reproducción sexual necesitan condiciones ambientales muy especiales las cuales son difíciles de encontrar actualmente

La gran mayoría de especies son terrestres ó aéreas sin embargo, existe un buen número que han sido reportadas para los ambientes marinos y dulceacuícolas. La mayoría de las especies son saprobias pero existen especies parásitas de plantas y animales incluyendo al hombre en los cuales, causan serias enfermedades. Existen Deuteromycetes que pueden capturar y digerir nemátodos mediante estructuras especializadas y/o toxinas. Las actividades bioquímicas de los Deuteromycetes tienen también su importancia para los humanos, ya que de algunos pueden obtenerse a nivel comercial, ciertos productos químicos incluso ciertos antibióticos, imposibles de obtener artificialmente (Webster,1980).

El único tipo de esporas que producen los Deuteromycetes son los conidios sin embargo, éstos presentan una gran variedad de formas, colores y tamaños (esféricos, ovoides, alargados, cilíndricos, espiralados, unicelulares, multicelulares, incoloros, coloreados) incluso, los conidióforos pueden darse aislados ó agrupados en estructuras especializadas (cuerpos fructíferos asexuales) por ello, existen nombres especiales para cada tipo de conidio (Alexopoulos,1996)

En esta Subdivisión Deuteromycota se reconoce una sola Clase: *Deuteromycetes* y tres Subclases: *Blastomycetidae*, *Coelomycetidae* y *Hyphomycetidae* (Figura I. 15):

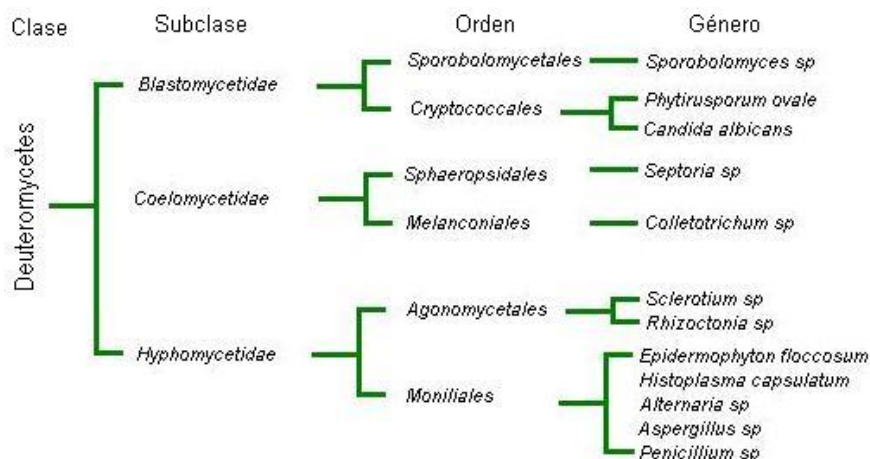


Figura I. 15. Clasificación de Deuteromycetes (Alexopoulos, 1996).

I.2.2.5. SUBDIVISIÓN BASIDIOMYCOTA

El Subdivisión Basidiomycota contiene cerca de 30.000 especies descritas, que corresponden aproximadamente al 37% de las especies de hongos verdaderos (Kirk y col. 2001). Los hongos pertenecientes a esta Subdivisión se encuentran virtualmente en todos los ecosistemas terrestres, así como habitat de agua dulce y marinas (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979; Hibbett y Binder, 2001).

Estos hongos tienen un enorme impacto sobre los ecosistemas humanos, pues su nutrición se basa en la descomposición de la materia orgánica muerta, incluyendo madera y restos de hojas. De esta forma los hongos de la Subdivisión Basidiomycota juega un papel significativo en el ciclo del carbono.

La Subdivisión Basidiomycota pertenece la Clase Basidiomycete, que se caracteriza en la mayoría de los casos por la presencia de basidios, células especializadas que tras la cariogamia y la meiosis producen cuatro basidiosporas - a veces más o menos - en su parte exterior.

El ciclo vital de un basidiomiceto típico (Figura I.16) es simple, caracterizándose por generar tres tipos de micelio: primario, secundario y terciario. Aunque hay especies levuriformes, lo más corriente es que, el micelio primario se desarrolle directamente a partir de la germinación de las basidiosporas (haploides); al principio sus hifas son multinucleadas, pero luego se tabican formando así el micelio multicelular monocariótico.

El micelio secundario se origina por plasmogamia de las células mononucleadas del micelio primario. Las células uninucleadas compatibles del micelio primario se fusionan entre sí formando células binucleadas ($n + n$); las células, así formadas, se multiplican y proliferan por mitosis desarrollando el micelio secundario dicariótico. El micelio terciario está representado por los tejidos especializados del cuerpo fructífero del hongo: el basidio, la fibula y el micelio dicariótico terciario.

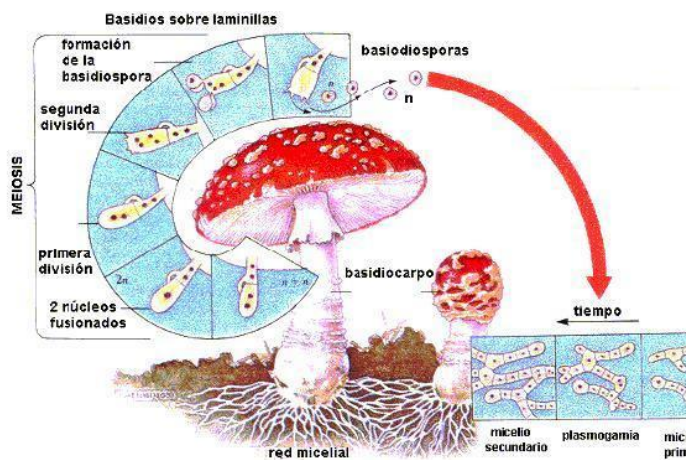


Figura I.16. Ciclo vital de un Basidiomycete

Al cuerpo fructífero de los Basidiomycetes se le puede llamar basidiocarpo, y los hay de varios tipos según su consistencia. Pueden ser delgados, tener formas de costras, ser gelatinosos, papiráceos, carnosos, esponjosos, leñosos, etc. Sólo los hongos Uredinales y Ustilanginales, miembros de este Clase, no forman basidiocarpos.

Los *Basidiomycetes* son hongos superiores y se dividen en tres Subclases (Figura I.17): *Holobasidiomycetidae*, *Fragmobasidiomycetidae* y *Teliomycetidae*, de acuerdo con el tipo de basidio que producen.

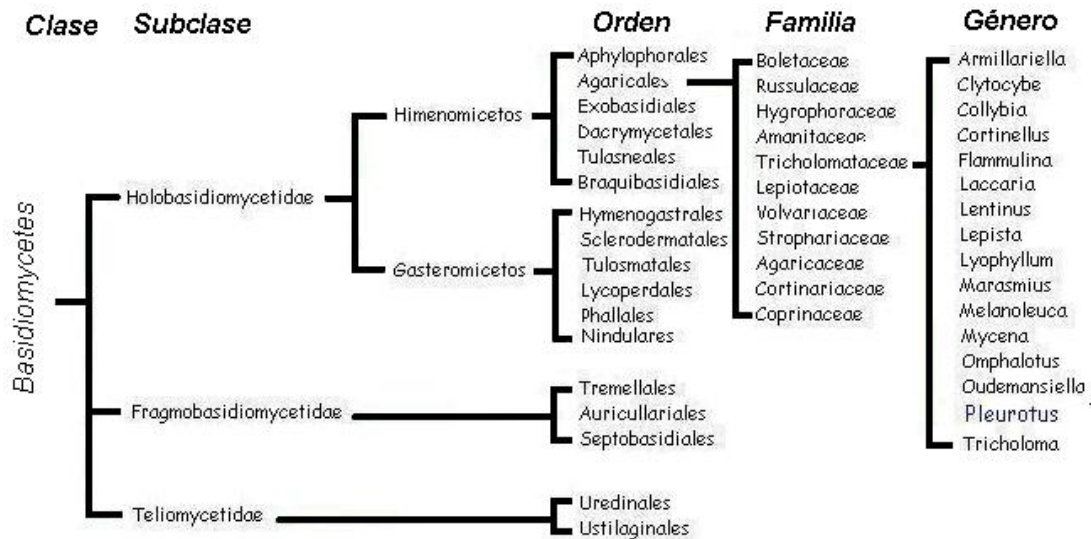


Figura I.17. Clasificación de los Basidiomycetes (Alexopoulos y col., 1996)

1.3.2.5.1 .SUBCLASE HOLOBACIDIOMYCETIDAE

Esta Subclase constituye el grupo más amplio y típico de los *Basidiomycetes*, poseen basidios no septados (unicelulares) con cuatro apéndices hifales (estirigmas) que contienen cada uno una basidiospora. Estos basidios que contienen las basidiosporas están dispuestos sobre laminillas, las cuales se reúnen en basidiocarpos bien desarrollados. Casi todos los hongos comestibles conocidos y también numerosos hongos venenosos figuran en este grupo. Entre los *Holobasidiomycetidae* se encuentran muchos Órdenes, Familias, Géneros y especies, por ello se hace una diferenciación en dos grandes grupos con categoría taxonómica: *Himenomicetos* y *Gasteromicetos*.

La diferencia fundamental es que los *Himenomicetos* tienen un himenio bien estructurado, más o menos claro, que puede estar tapizando las laminillas o bien tapizando el interior de un tubo. Los basidios están bien ordenados en una parte del basidioma. Entre los *Himenomicetos* se incluyen seis Órdenes: *Aphylophorales*, *Agaricales*, *Exobasidiales*, *Dacrymycetales*, *Tulasneales*, y *Braquibasidiales*. El hongo *Pleurotus* se incluye en el orden *Agaricales*. Los *Gasteromicetos* forman un basidio mezclado con basidiosporas, hifas y formando una masa fértil llamada gleba. Entre los *Gasteromicetos* también se incluyen seis Órdenes: *Hymenogastales*, *Sclerodermatales*, *Tulostomatales*, *Lycoperdales*, *Phallales*, y *Nindulares*.

1.2.2.5.2. SUBCLASE FRAGMOBASIDIOMYCETIDAE

La Subclase *Fragmobasidiomycetidae* presenta en general basidios septados en forma longitudinal o transversal (fragmobasidios) y basidiocarpo. Las basidiosporas pueden germinar por repetición, produciendo esporas secundarias. En ella se incluyen diversos hongos parásitos y saprófitos. En esta Subclase se incluyen solamente 3 Órdenes: *Auriculariales*, *Tremellales*, y *Septobasidiales*.

I.2.2.5.3. SUBCLASE TELIOMYCETIDAE

En esta Subclase se presentan basidios septados y no tienen basidiocarpo. Producen teliosporas, esporas de resistencia de pared gruesa, binucleadas, en las que tiene lugar la cariogamia. Incluyen los hongos patógenos conocidos como royas (*P. graminis*, roya negra de los cereales) y carbones (tizones), además de los basidiomicetos levuriformes. Se separan en dos Órdenes: *Uredinales* y *Ustilaginales*.

I.2.3. HONGOS SAPRÓFITOS

Los hongos saprófitos se nutren de sustancias que se producen como resultado de la descomposición de la materia orgánica muerta. Para ello estos hongos están dotados de efectivos complejos enzimáticos, capaces de degradar fuentes de carbono complejas como la celulosa, la lignina o el almidón, en moléculas más sencillas y nutritivas como azúcares y aminoácidos. Estas enzimas presentan distinto grado de efectividad en la degradación de los sustratos, condicionando la mayor o menor especialización de los hongos saprófitos. Mientras algunos hongos aprovechan indistintamente materia orgánica de origen diverso, otros prefieren sustratos más específicos, como aquellos lignocelulolíticos capaces de degradar la madera. (Müller, 1976; France, 2002).

La descomposición o pudrición de la madera se traduce en una serie de cambios en sus propiedades fisicomecánicas como pérdidas de resistencia, de peso, de volumen o cambios de color. Las distintas especies de maderas presentan diferente susceptibilidad a las micosis en función de su densidad, permeabilidad, textura, contenido en fenoles, resinas, taninos, etc. En todos los niveles de explotación maderera se deben observar medidas preventivas. Las pudriciones de los árboles en pie se reducen evitando herir dichos árboles, para lo cual se debe controlar la operación de las máquinas durante las labores silvícolas (Vignote, 1996). En cuanto a la madera ya cortada, puede evitarse la entrada de hongos saprófitos con una serie de medidas como realizar los cortes en épocas frías del año, aserrando de inmediato al proceso de corte, almacenamiento aireado, secado controlado, impregnaciones especiales, etc.

Los hongos saprófitos son capaces de degradar otros sustratos además de la madera. Así, son de especial interés ecológico aquellos descomponedores de los productos presentes en los horizontes superficiales del suelo. Algunos ejemplos de este tipo de saprófitos son los champiñones como *Agaricus macrosporus*, *Marasmius oreades* o *Macrolepiota procera*. La diversidad y composición específica de este grupo de saprófitos en un determinado lugar dependerá de múltiples factores derivados de la naturaleza del sustrato, como el pH, fertilidad, textura, estructura, etc.

Hay autores que describen una sucesión de especies fúngicas saprofitas asociada a cambios en la composición química de dicho sustrato durante el proceso de la descomposición. También señalan ciertas relaciones interespecíficas. Por ejemplo, algunos hongos lignícolas producen carbohidratos solubles como subproductos de la descomposición de la lignina, que parecen favorecer la colonización posterior de otros saprofitos (Moorhead y Reynolds, 1992).

Otro grupo interesante de saprofitos especializados en la degradación de los excrementos de diversos animales son los hongos llamados coprófilos. En general, las esporas de estos hongos requieren ser ingeridas y pasar por el tracto digestivo de algún herbívoro para germinar, encontrando en dichos excrementos un sustrato óptimo para su desarrollo. Un ejemplo es la especie *Stropharia semiglobata*.

I.2.4. HONGOS COMESTIBLES

Los hongos comestibles se agrupan en lignícolas o hongos de pudrición blanca y micorrízicos. Los primeros crecen a expensas de la descomposición de sustratos vegetales ricos en fibra, como son los tallos lignificados y las maderas duras que poseen celulosa, hemicelulosa y lignina. Las micorrizas crecen asociadas a las raíces de las plantas, por lo que su existencia depende de estas últimas. Entre la gran variedad que existe en ambos grupos, encontramos algunos que son de gran sabor y muy apetecidos, así como por sus propiedades medicinales que garantiza una demanda permanente, motivando el estudio de métodos de cultivo artificial.

Dentro de los hongos lignícolas que se cultivan con mayor frecuencia, se encuentra el champiñón de París (*Agaricus bisporus*), el Hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*), el Shiitake (*Lentinus edodes*), el Gargal (*Grifola garga*), el Changle (*Ramaria flava*), Oreja de Palo (*Auricularia polytricha*) y Enoki u Hongo Dorado (*Flammulina velutipes*). Estos hongos son factibles de encontrar en praderas naturales, tocones o troncos de árboles muertos (France, 2002).

Con respecto a los hongos micorrízicos se destacan la Hongo del Pino (*Boletus luteus*), la Callampa Rosada (*Lactarius deliciosus*) y Morchela o Colmenilla (*Morchella* spp.), los Canterelus (*Cantharellus cibarius*), el Loyo del Monte (*Boletus loyo*), la Oronja (*Amanita caesarea*) y el Chicharrón del Campo (*Gyromytra antartica*). Es conveniente señalar que no necesariamente los hongos que eventualmente se producen o colectan en forma silvestre, son de uso culinario, en el futuro es posible que se estén cultivando hongos medicinales o de uso industrial (France, 2002).

La importancia económica de los hongos saprofitos comestibles no es despreciable. Especies como *Agaricus bisporus* "champiñón", *Pleurotus ostreatus* "seta de chopo", *Pleurotus eryngii* "seta de cardo" se encuentran entre las más consumidas y comercializadas en España (Delmas, 1989).

El cultivo industrial de hongos saprofitos comestibles se ha conseguido con algunas especies. Resulta necesario el control de ciertas condiciones ambientales como la temperatura, humedad, aireación y fotoperíodo, con necesidades diferentes en función del grado de desarrollo del carpóforo. La elección de un sustrato adecuado al equipamiento enzimático de cada especie y que responda a ciertas condiciones estructurales, es imprescindible para el éxito de la producción (Delmas, 1989).

I.2.5. HONGO *Pleurotus ostreatus*

En la Clase Basidiomicetes destacan los hongos del Género *Pleurotus*, hongos comestibles, de gran valor nutritivo, poco exigentes en relación al sustrato y de buen desarrollo en condiciones rústicas (Schmidt y col, 2003). Su color es blanco o castaño, aunque hay variedades azuladas y rosadas. Su carne es compacta y fibrosa en el sombrero, y blanca en el pie con sabor y olor agradable (Romero, 2002). Entre las numerosas especies existentes, las más conocidas son *ostreatus*, *sajor-caju*, *florida*, *cornucopiae*, *eryngii*, *tuber regium*, *pulmonaris*, y *djamour* (Mendoza y Díaz, 1981; Alexopoulos y col, 1996; Pardo, 1995; Área Metropolitana del Valle de Aburrá, 2000).

Pleurotus ostreatus es un hongo saprofito o parásito débil, descomponedor de madera; crece abundantemente sobre aliso, balsa y arce, principalmente en los valles de los ríos. La palabra *pleurotus* viene del griego "pleuro", que significa formado lateralmente o en posición lateral, refiriéndose a la posición del estípite respecto al píleo; *ostreatus* en latín quiere decir en forma de ostra y se refiere a la apariencia y al color del cuerpo fructífero (Stamets & Chilton, 1983).

El sombrerillo de esta seta (cuerpo fructífero) es redondeado, con la superficie lisa, abombada y convexa cuando es joven, la forma de las conchas de las ostras, por esta razón es que comúnmente se le llama "hongo ostra" (Oyster Mushroom), aplanándose luego poco a poco. El borde está algo enrollado al principio. El color es variable, crema, blanco, gris claro hasta pardo, tomando una coloración más amarillenta con el tiempo.



Figura I.18. Hongo *Pleurotus ostreatus* en su habitat natural

Los hongos en general presentan casi siempre forma de sombrilla o sombrero circular (píleo) y un eje o pie (estípite) que los sostiene (Figura I.18). En la cara inferior de la sombrilla abierta, hay laminillas (himenio) que van desde el centro hasta el borde del sombrero. La reproducción se realiza por las esporas que se originan en las láminas y se producen en una cantidad tan grande, que si las colocamos sobre un papel se observará un polvo harinoso. Cuando una spora se encuentra en el medio adecuado, germina y forma una hifa que crece y se ramifica (micelio), éste se asemeja al algodón en donde las fibras corresponden a las hifas (Guzmán y Mata, 1993).

El píleo, donde se encuentran las lamelas o laminillas, es excéntrico cuando crece en superficies verticales y es central cuando crece en camas, de superficie lisa y brillante, y un poco viscosa en tiempo húmedo (Cadavid y Cardona, 1996); el estípite es corto y excéntrico; las lamelas son blancas, decurrentes y espaciadas ampliamente; las esporas en masa son blanquecinas o de color gris-blanquecino. Posee regularmente de 4 a 13 cm. de diámetro, aunque ocasionalmente puede presentar tamaños mayores de acuerdo a las condiciones de fructificación; la superficie superior presenta color variable según la intensidad de la luz, con tonos entre blanquecinos, grises o azulados, según sea la

iluminación; su margen es suave, delgado, ondulado y ocasionalmente enrollado. Presenta pie corto de 2 a 3 cm. de longitud por 1 a 2 cm. de grueso, y fibras de color crema claro (Stamets y Chilton, 1983; Cardona y Bedoya, 1996).

I.2.5.1 CULTIVO DE *Pleurotus ostreatus*

El proceso de cultivo de obtención de *Pleurotus ostreatus* consta de 6 etapas selección y caracterización del sustrato, preparación del sustrato, preparación del inóculo, siembra del inóculo e incubación, colonización y fructificación, y cosecha.

I.2.5.1.1. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO

En la fase de selección del sustrato se consideran los materiales que sirven como fuente de alimento al micelio del hongo, y además, que favorecen la reproducción y crecimiento del mismo, soportándolo y facilitando así su transporte y manipulación; se recomienda el uso de la paja de trigo y en general, materiales celulósicos de pequeña granulometría (Romero y col, 2002).

La composición de la paja depende de la proporción de hojas/tallos, el diámetro del tallo y la altura de la planta, de modo que se presentan variaciones ligadas a la especie, el ecotipo o la climatología. Las pajas más abundantes en España por la extensión de su área de cultivo y su facilidad de recolección son las de trigo y cebada. Ambas tienen una composición similar, y la mayor parte de los componentes de las pajas de cereales (incluyendo proteína y minerales), están asociados a la pared celular. Como media, contienen un 71% de FND distribuida en un 40% de celulosa, un 23% de hemicelulosa, un 8% de lignina y un 0,2% de cutina. Las dos primeras son potencialmente fermentables por la flora digestiva, pero su degradación se ve limitada por la estructura cristalina de la celulosa y por la existencia de enlaces covalentes con la lignina (FEDNA, 2003). Respecto a las maderas, no existen limitaciones para utilizar diferentes especies. Sin embargo, se prefieren maderas blandas, como álamos y sauces. No es recomendable el uso de especies como pinos o eucaliptos, debido a que imprimen un inconveniente gusto a resinas en los hongos (France, 2002).

I.2.5.1.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

Cualquiera sea el sustrato seleccionado en la fase anterior, que seguramente corresponderá a materiales lignocelulósicos, deben ser sometidos a un proceso de preparación física que incluye el troceado o molienda para lograr un tamaño de partícula homogéneo. Posteriormente el sustrato ya troceado se somete a un tratamiento térmico para evitar contaminaciones futuras con otros microorganismos, y un posterior escurrido para dejar un contenido de humedad entre 70-75% y un tratamiento con funguicida, que elimine la presencia de otros hongos.

La preparación de sustratos a base de paja de cereales (centeno, trigo o cebada) requiere los siguientes pasos:

- Mojado de los montones de paja en depósitos durante 1 ó 2 días, en mezcladoras o mediante sistemas de riego por aspersión. La temperatura no debe sobrepasar los 60° C para evitar problemas futuros con hongos del Género *Trichoderma*. La humedad de la masa de paja deberá ser del 70-80 %. Se añadirá carbonato cálcico para que el pH sea de 6,5.
- Enriquecimiento del sustrato. Algunos cultivadores añaden creta molida, heno picado, harina de maíz, harina de soja, harina de girasol, alfalfa deshidratada, salvado de arroz, etc. Al sustrato se le añaden distintos aditivos para mejorarlo y proporcionar mayor producción: harina de plumas (5%), yeso (10-40%), etc.
- Tratamiento térmico. Este proceso térmico tiene por objeto bajar la carga microbiana contaminante del sustrato. La forma más común de pasteurizar es el uso de agua caliente a temperaturas superiores a 85°C, pero también se puede usar vapor. El tiempo depende del estado del sustrato. Si es de buena calidad y limpio, pueden bastar 30 minutos, pero si es antiguo y contaminado se debe aumentar el tiempo a más de una hora. La madera no necesita de pasteurización. La temperatura y el tiempo de pasteurización varía según los sitios. En general se emplean temperaturas comprendidas entre los 65-80°C durante unas 5-6 horas, con periodos intermedios de 50° C durante 1-2 días. Así de una tonelada métrica de paja se obtienen entre 2 y 3 toneladas de sustrato. Cuando el sustrato tiene entre 20-25° C y un 70% de humedad ya está preparado para la inoculación del micelio.

I.2.5.1.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Este proceso es utilizado para la mayoría de las especies de hongos comestibles conocidos, y abarca 2 etapas fundamentales: la primera es la obtención del medio de cultivo artificial de laboratorio, donde el hongo se desenvuelve (crecimiento del micelio), y la segunda es la transferencia de discos de inoculación en un sustrato que contiene granos de cereales.

Para la primera etapa, el medio de cultivo PDA (patatadextrosa - ágar) es el más utilizado, y puede ser adquirido comercialmente en formato de semipreparado. Luego de esto, fragmentos de hongos son transferidos al medio de cultivo para la obtención del micelio. Después se hace crecer sobre granos de cereales (que son precocidos y acondicionados en recipientes esterilizados que contienen yeso agrícola), y una vez colonizados, se envasan para la venta. Este inóculo se obtiene comercialmente utilizando el sistema de reproducción asexual, con lo cual se mantienen las características del hongo que se quiere inocular.

I.2.5.1.4. SIEMBRA DEL INÓCULO E INCUBACIÓN

La siembra consiste en mezclar el micelio con la paja o sustrato ya preparado, de un modo uniforme. La cantidad de micelio recomendada es de 4-6% del peso seco. A mayor cantidad de inóculo el desarrollo del hongo será más rápido y abundante pero la temperatura también será mayor, lo que perjudicará al desarrollo del micelio

El sustrato sembrado se introduce en sacos de plástico transparente de 15 a 30 Kg. de capacidad. También se pueden emplear jaulas o cajones de tela metálica de malla amplia recubiertos de plástico. Pero las condiciones básicas que han de reunir los envases son:

- Su tamaño no puede sobrepasar los 50 cm. en ninguna de sus dimensiones, para facilitar el transporte.
- La mayor parte de la superficie ha de ser vertical para obtener setas de mayor calidad.
- Los bloques de sustrato se colocan en la sala de incubación a 18-22° C. Para que el micelio crezca ha de estar a una temperatura óptima de 25-28 ° C en condiciones de oscuridad y con 70-80 % de humedad relativa. A los 15-20 días el micelio habrá invadido el sustrato.

El bajo intercambio gaseoso permite que se acumule CO₂ producto de la respiración y crecimiento del hongo. Este tipo de hongos puede soportar altísimas concentraciones de CO₂, permitiendo la eliminación de contaminantes que no toleran dichas condiciones. Las bolsas de plástico perforadas cumplen con los requisitos de restringir el intercambio de gases y, a la vez, mantener una alta humedad del sustrato.

I.2.5.1.5. COLONIZACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN

La colonización del micelio termina cuando el sustrato se encuentra completamente colonizado, lo cual se nota por el color blanco que adquiere. Este proceso puede durar, en condiciones óptimas, unos 20 a 30 días. En la actualidad se cambia bruscamente el ambiente de crecimiento del hongo, mediante una disminución de la temperatura (15-18°C), presencia de ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, y aumento del intercambio gaseoso. En el caso de cultivo en bolsa, ésta se retira exponiendo la masa colonizada al aire. Aproximadamente en una semana aparecen los primeros botones que son del tamaño de la cabeza de un alfiler.

Posteriormente se producen los sombreros, también llamados carpóforos, basidiocarpos o callampas. Los sombreros nacen en ramilletes de varios ejemplares, desarrollándose en 4 a 5 días desde que se observan los primeros botones. El tamaño óptimo de cosecha son sombreros de unos 10 a 12 cm, pero dependiendo del objetivo de la producción se pueden coleccionar sombreros más pequeños o de mayor tamaño. Es importante que en esta etapa no falle la humedad, de lo contrario los sombreros se deshidratan y los bordes se parten, afectando la calidad. La humedad debe mantenerse entre 80 y 90%, lo cual se logra mojando las paredes y pisos de la sala. También se pueden mojar los sustratos, pero con la condición que el agua este limpia y libre de cloro.

I.2.5.1.6. COSECHA

La cosecha se realiza en forma manual, cortando los sombreros con cuchillos bien afilados para evitar remover el sustrato. Hay que tener presente que los hongos se producen en oleadas, por lo que el sustrato no debe ser maltratado pensando en la próxima cosecha. Luego de la cosecha, los

substratos se vuelven a mojar y se mantienen en las condiciones descritas en incubación. De esa manera, se vuelve a producir una segunda oleada a los 5 a 7 días. Se puede esperar 3 a 4 oleadas de hongos, pero la producción de cada una de ellas es cada vez menor. Un sistema productivo bien manejado puede llegar a producciones que vienen a corresponder a un 20% del peso del sustrato.

I.3. VERMICOMPOSTAJE: *Eisenia fetida*



I.3.1. ANTECEDENTES

La influencia de las lombrices en los suelos agrícolas era conocida en el Antiguo Egipto. Los faraones la consideraban "animal sagrado" y preveían castigos muy severos para quienes las dañaran. El filósofo griego Aristóteles las definió como "los intestinos de la tierra". Los romanos también apreciaron a las lombrices, aunque no es hasta el siglo XIX cuando Darwin, en su libro "La Formación de la Tierra Vegetal por la Acción de las Lombrices" publicado en 1881, explica la verdadera función de estos invertebrados en el suelo. Esta obra sería el inicio de una serie de investigaciones que hoy han transformado el vermicompostaje, vermiestabilización o compostaje con lombrices y la lumbricultura en una actividad zootécnica muy importante que permite mejorar la producción agrícola (Martínez y col., 2003)

La primera referencia de los beneficios del vermicompostaje, entendido como el uso de las lombrices para la eliminación de los residuos orgánicos, fue aportada por el monje benedictino Augustus Hessing, en los años 30, cuando utilizaba lombrices para eliminar los residuos que producía el monasterio. A mediados de los años 40 se comenzó en Estados Unidos la cría intensiva de lombrices con el fin de obtener vermicompost o humus de lombriz. Inicialmente, se utilizó la especie *Eisenia foetida*, también conocida como lombriz roja californiana, la cual posteriormente por razones de crianza, reproducción y por la variedad de residuos orgánicos que ingieren, ha resultado ser la lombriz más adecuada para los procesos de vermicompostaje y sistemas de lumbricultura. Sin embargo, el conocimiento científico de los procesos de vermicompostaje se inició en los años 1970 en Estados Unidos por los profesores Clive A. Edwards y E. Neuhauser (Cornell University) y R. Hartenstein (State University of New York, Siracuse) que sentaron las bases científicas y técnicas de desarrollo de estos sistemas. Posteriormente estos procesos se han desarrollado espectacularmente en diferentes países de Europa (Gran Bretaña, Italia, Holanda, España), África (República Sudafricana), Sudeste de Asia (Filipinas, China, India), América (Estados Unidos, Cuba, Colombia, Argentina, Ecuador) y Australia (Martínez y col., 2003).

I.3.2 DEFINICIÓN DEL PROCESO DE VERMICOMPOSTAJE

El vermicompostaje es un proceso de biooxidación, degradación y estabilización de la materia orgánica mediada por la acción combinada de lombrices y microorganismos, mediante el cual se obtiene un producto final estabilizado, homogéneo y de granulometría fina denominado vermicompost, lumbricompost, compost de lombriz o humus de lombriz. Esta práctica de biotransformación aprovecha varias de las ventajas derivadas de la actividad de algunas especies de lombrices, las cuales aceleran la descomposición y humificación de la materia orgánica, ya sea de un modo directo (alimentación detritívora y desplazamiento a través de galerías) o indirecto (estimulación de la actividad microbiana). Por otro lado, mejoran la estructura del producto final, al provocar, por el

paso del residuo a través del sistema digestivo de la lombriz, la ruptura de los materiales orgánicos, reduciendo su tamaño de partículas y favoreciendo la formación de agregados estables. Además la actividad de estos detritívoros aumenta el contenido de nutrientes, convirtiéndolos a través de la actividad microbiana, en formas solubles y asimilables por los cultivos. Asimismo, mediante este proceso se favorece la producción de sustancias que pueden actuar con acción fitohormonal sobre las plantas. Por último, el proceso de vermicompostaje posibilita la explotación de las lombrices como fuente proteica para consumo animal.

El proceso de vermicompostaje ha sido utilizado para la biodegradación de un gran número de residuos orgánicos, y se considera como una ecotecnología limpia, sin impacto ambiental y cuyos costes de inversión, energéticos y de mantenimiento son moderadamente bajos. Su utilización aporta los siguientes beneficios: a) Eliminación de residuos orgánicos nocivos, insalubres, molestos y de difícil gestión, b) Generación de un producto final útil (vermicompost), de gran valor como enmienda orgánica del suelo de alta calidad, que puede funcionar como un abono órgano químico, c) Producción de una gran biomasa de lombriz, de alto contenido proteico y de alta calidad para alimentación animal (avícola, porcino y piscícola, fundamentalmente).

I.3.3. ORGANISMOS IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE VERMICOMPOSTAJE

I.3.3.1 LOMBRICES DE TIERRA

De las más de 4400 especies de lombrices terrestres identificadas, solamente una media docena de ellas, pueden ser utilizadas en la degradación de residuos orgánicos. Estas lombrices, pertenecientes taxonómicamente al Orden *Haplotaxida* y Familia *Lumbricidae*, se agrupan en la categoría ecológica de epigeas, que poseen una estrategia reproductiva "r" (rápida y prolífica), lo cual permite que sucesivas generaciones se vayan sustituyendo de manera continua, manteniendo por ello unas altas tasas de consumo del sustrato orgánico, lo cual acelera su degradación. En zonas tropicales y subtropicales las especies más efectivas son *Eudrilus eugeniae* y *Perionyx excavatus*, mientras que en climas templados las más utilizadas son *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, y en menor medida *Dendrobaena veneta* y *Lumbricus rubellus*.

Eisenia fetida (Figura I.19) y *Eisenia andrei* (Figura I.20) han demostrado ser las más eficientes para la biodegradación de residuos orgánicos y las más comúnmente utilizadas. A nivel morfológico son muy parecidas: *E. fetida* de color marrón con bandas intersegmentarias pálidas y/o amarillentas, por lo que es conocida como lombriz rayada o lombriz tigre y *E. andrei* con pigmentación homocrómica rojo oscuro sin bandas (lombriz roja). Sobre *E. andrei* hay menor información sobre su aptitud para el vermicompostaje, debido a que hasta hace relativamente poco tiempo *E. fetida* y *E. andrei* fueron consideradas una única especie con dos formas cromáticas *E. fetida* var. *typica* y *E. fetida* var. *unicolor*, o como dos subespecies distintas: *E. fetida fetida* y *E. fetida andrei* (Bouché, 1972). Estudios

recientes basados en diferencias bioquímicas, espectroscópicas, moleculares y reproductivas (Domínguez y col., 2003a, 2005; Perez-Losada y col., 2005) han confirmado la existencia de ambas especies, habiéndose puesto de manifiesto que en condiciones naturales *E. fetida* posee más ventajas adaptativas, mientras que en medios de cultivos controlados *E. andrei* compite y termina desplazando a *E. fetida*. Este desconocimiento de la diferencia entre las dos especies, podría llevar a la conclusión de que numerosos trabajos de vermicompostaje en los que se hace mención a *E. fetida*, pueda tratarse de esta especie, de *E. andrei* o muy posiblemente de una mezcla de ambas especies ya que pueden compartir nicho ecológico aunque no se cruzan entre ellas de forma natural.



Figura I.19. *Eisenia foetida*



Figura I.20. *Eisenia andrei*

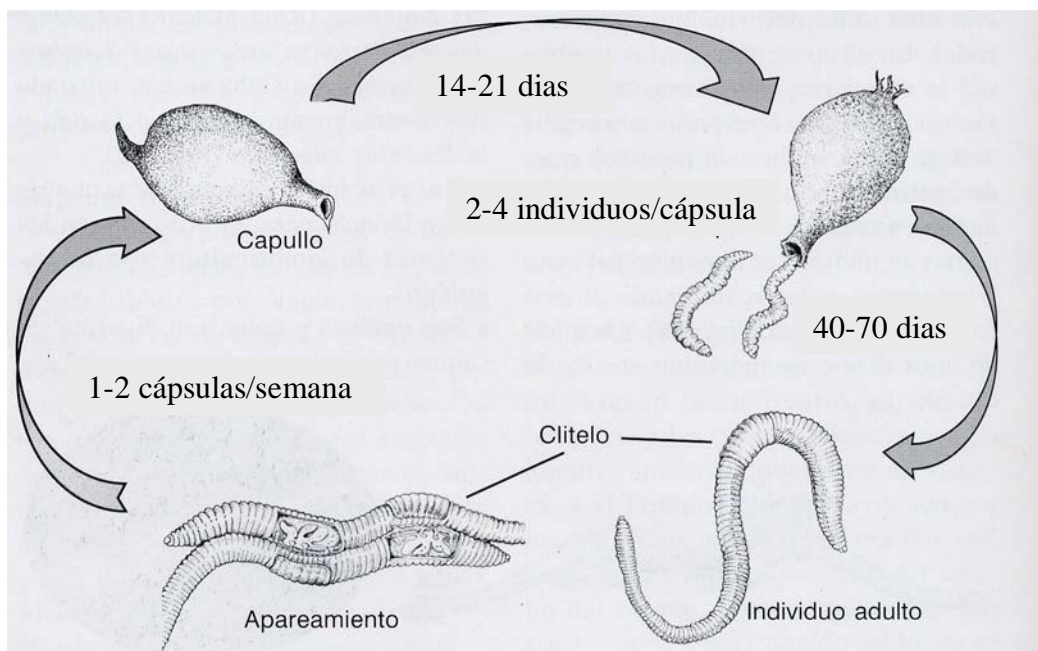


Figura I.21. Ciclo biológico de *E. fetida* y *E. andrei*

Pese a las diferencias encontradas entre las dos especies, ambas presentan características comunes: a) La longitud corporal media es de 60-120 mm y un diámetro de 3-6 mm, b) El número medio de segmentos varía entre 80 y 120, c) El clitelo, con forma de silla de montar ocupa entre 6-8 segmentos y los tubérculos pubertarios se extienden a lo largo del borde ventral del clitelo en tres segmentos, d) Las cápsulas tienen un diámetro entre 2,3 y 4,4 mm, y su longitud varía entre 2,4 y 5,2 mm., e) La vida de estas especies puede alcanzar hasta los 15 años, si las condiciones son favorables, f) Ambas especies maduran sexualmente a los dos meses de vida. El acoplamiento de dos lombrices se efectúa con no menos de 7 días entre uno y otro, del cual se obtienen entre 1 y 2 cápsulas/semanales por cada lombriz. Si las condiciones del medio son óptimas, después de 14-21 días de incubación, eclosiona la cápsula y nacen entre de 2 y 4 lombricillas de color rosado pálido translúcido, en condiciones de moverse y nutrirse de inmediato. Las nuevas lombrices alcanzan su madurez sexual entre 40 y 70 días de su nacimiento dependiendo de las condiciones del cultivo

I.3.3.2. MICROORGANISMOS

En los procesos de vermicompostaje, al igual que sucede en los de compostaje, se encuentran involucrados un gran número de microorganismos, fundamentalmente bacterias, hongos y actinomicetos mesófilos. El desarrollo y actividades de las lombrices y microorganismos se encuentran estrechamente ligados, ya que por una parte los microorganismos constituyen una parte fundamental de la dieta de las lombrices, con una importancia de menor a mayor de bacterias, algas, hongos y protozoos; y por otra las lombrices modifican la estructura física de los residuos, fragmentando la materia orgánica y aumentando su superficie, lo cual incrementa la actividad de los microorganismos (Edwards, 1998). Además, el aparato digestivo de la lombriz es un sistema complejo, similar para algunos autores al rumen, en el cual existen, cohabitan e intervienen diferentes microorganismos y participan diferentes actividades enzimáticas, que modifican sustancialmente la composición química y microbiológica del material orgánico ingerido (Drake y col., 2006).

Por esos motivos, así como por otros (diversidad de la naturaleza de los residuos orgánicos, densidad poblacional y tipo de lombrices involucradas, etc.) el conocimiento sobre los grupos de microorganismos y su evolución durante los procesos de vermicompostaje todavía es muy escaso, y los resultados obtenidos en muchos casos son contradictorios. Así, Aira y col (2002) utilizando purines de cerdo observaron un descenso de la biomasa total microbiana, especialmente durante los primeros días del proceso de vermicompostaje. Romero y col (2006a) han puesto de manifiesto un descenso del número de bacterias y un aumento del número de hongos en los productos finales obtenidos en un proceso de vermicompostaje utilizando, respectivamente, estiércol de conejo o residuos vitivinícolas. El estudio de la dinámica y de la biodiversidad microbiana involucrada en los procesos de vermicompostaje constituye una actividad científica a desarrollar en el futuro, para lo cual el uso de técnicas de biología molecular puede constituir una herramienta eficaz para ese fin.

I.3.3.3. FAUNA ASOCIADA

En los procesos de vermicompostaje, especialmente aquellos realizados a gran escala, pueden participar muchos organismos que colonizan los residuos orgánicos para alimentarse de la materia orgánica o utilizarlo como escondite. Un ejemplo son los organismos detritófagos como cochinillas u otros insectos que pueden competir con las lombrices por el alimento. Además, pueden encontrarse asociados otros invertebrados que participan en la descomposición del sustrato orgánico como nematodos, ácaros e insectos detritófagos que compiten con la lombriz por el alimento sin causar daños directamente. Todos estos organismos se conocen como fauna asociada o acompañante. De todas formas, hay destacar que en un proceso correctamente manejado, ninguno de los organismos mencionados es capaz de causar perjuicio a las lombrices, e incluso algunos de ellos como los nematodos disminuyen durante el vermicompostaje (Domínguez y col. 2003b), lo que únicamente puede ocurrir cuando no se cumplan las condiciones para el correcto desarrollo del mismo (Martínez y col., 2003).

I.3.4. FACTORES QUE REGULAN EL PROCESO DE VERMICOMPOSTAJE

La posibilidad de utilizar lombrices epigeas en la biodegradación de los residuos orgánicos, así como en la obtención de vermicomposts y proteína de lombriz, depende de una serie de factores que hay que tener en cuenta para el correcto desarrollo del proceso de vermicompostaje: la naturaleza, características y acondicionamiento de los residuos orgánicos o materiales de partida y la necesidad de mantener una serie de variables ambientales dentro de unos límites adecuados para el adecuado crecimiento y reproducción de las lombrices y el correcto control del proceso.

I.3.4.1 NATURALEZA Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS O MATERIALES DE PARTIDA

Existe un gran número de residuos orgánicos generados por las actividades agrícolas, urbanas e industriales de nuestra sociedad que han sido ensayados y utilizados óptimamente en los procesos de vermicompostaje. Estos residuos se clasifican en:

a) Convencionales o residuos naturales de crecimiento de las lombrices: Estiércoles de vacuno, ovino, caballo (Elvira y col., 1996a,b; Benítez y col., 2002)

b) No convencionales o residuos no naturales de crecimiento de las lombrices: purines de cerdo (Aira y col., 2002; Domínguez, 1996), lodos de depuradoras urbanas (Benítez y col., 1999a,b; Domínguez y col., 2000), lodos de industrias de celulosa y papel (Elvira y col., 1997; Elvira y col., 1998), lodos de industrias lácteas (Nogales y col., 1999a; Elvira y col., 1999), residuos oleícolas (Benítez y col., 2002; Nogales y col., 1998, 99b), residuos vitivinícolas (Nogales y col., 2005), etc.

En algunos casos es necesario acondicionar previamente esos residuos orgánicos para permitir la supervivencia de las lombrices inoculadas. Ello es exigible en los siguientes casos:

a) Estructura física inadecuada de los residuos: como es el caso de los lodos de depuradora, por lo que hay que mezclarlos con materiales estructurantes para obtener un sustrato lo suficientemente aireado y poroso que permita no solo el desplazamiento de las lombrices, si no también el paso del aire y el drenaje excesivo de agua (Domínguez y col, 2000).

b) Elevada salinidad de los residuos. Se ha comprobado una estrecha relación entre la salinidad del sustrato y la composición iónica de los fluidos internos de las lombrices. Por ello, concentraciones elevadas de sales en los residuos pueden tener efectos inhibitorios en la reproducción y desarrollo de las lombrices e incluso puede llevar a la muerte de los individuos. En *E. fetida* y *E. andrei*, conductividades del extracto de saturación de los residuos superiores a 8 dS m^{-1} son letales (Edwards, 1988). El lavado previo de esos residuos es la técnica de acondicionamiento más utilizada.

c) Elevada concentración de amonio. Niveles de amonio por encima de $0,5 \text{ mg g}^{-1}$ de sustrato son tóxicos para las poblaciones de *E. fetida* y *E. andrei* (Edwards, 1988; Domínguez, 2004). Por tal motivo algunos lodos de depuradora tienen que ser aireados durante varios días para facilitar la volatilización de amonio antes de ser utilizados como alimento de las lombrices (Benitez y col., 1999a).

d) pH inadecuado. Aunque *E. fetida* y *E. andrei* que toleran valores comprendidos entre 5 y 9, prefieren valores cercanos a la neutralidad (Edwards y Bohlen, 1996)

e) C/N inadecuado. Aunque *E. fetida* y *E. andrei* pueden degradar residuos con relaciones C/N elevadas o bajas, se aconseja utilizar materiales orgánicos con C/N entre 20 y 30, por lo que la mezcla de varios residuos puede constituir el método más apropiado de acondicionamiento.

f) Concentración elevada de metales pesados y contaminantes orgánicos. Los metales pesados y contaminantes orgánicos pueden provocar alteraciones en el metabolismo de las lombrices, afectando al crecimiento, desarrollo sexual, producción de cápsulas e incluso a la supervivencia de éstas. Una pequeña cantidad de los metales ingeridos por las mismas puede incorporarse a los tejidos a través de la absorción intestinal (Fleming y Richards, 1982), y si ésta va a ser utilizada como proteína animal o como complemento a piensos de animales es conveniente regular el contenido de metales presentes en los residuos a vermicompostar. Además, la mayoría de estos metales pasan de nuevo al medio por las deyecciones de la lombriz, lo cual afectaría negativamente a la calidad de los vermicomposts obtenidos.

I.3.4.2. HUMEDAD

La exigencia de un medio ambiente húmedo para las lombrices está directamente relacionada con el mecanismo respiratorio de las mismas ya que el intercambio gaseoso ocurre a través de la epidermis húmeda. Esto implica que durante el periodo de vermicompostaje la humedad se controle

mediante riegos periódicos para mantenerla cercana a lo óptimos. Las lombrices implicadas en los procesos de vermicompostaje, *E. fetida* y *E. andrei* pueden sobrevivir entre un 50 y 90% de humedad, encontrándose su óptimo alrededor del 85% (Dominguez y Edwards, 1997; Edwards, 1988)

I.3.4.3 TEMPERATURA

La temperatura, junto con la humedad, es el factor que más afecta a la actividad, metabolismo, crecimiento y reproducción de las lombrices. Los sistemas de vermicompostaje deben llevarse a cabo a temperaturas comprendidas entre 10 y 35°C. *Eisenia fetida* y *E. andrei* se desarrollan óptimamente a 25°C, aunque su carácter epígeo le permite sobrevivir entre los 0 y 35°C (Domínguez, 2004).

I.3.4.4 AIREACIÓN

El sustrato orgánico debe tener unas condiciones de aireación óptimas para el desarrollo de las lombrices y para el buen funcionamiento del proceso de vermicompostaje. Este parámetro depende de las condiciones físicas del propio medio, aunque las lombrices con su propio desplazamiento a través de galerías y actividad contribuyen a la aireación. La cantidad de oxígeno necesaria, entre 55 y 65% (Edwards y Bohlen, 1996), puede verse reducida por un exceso de agua o por la compactación del material debido a una estructura demasiado densa o por un exceso de peso.

I.3.4.5. DENSIDAD DE POBLACIÓN

La densidad de población puede afectar al desarrollo adecuado del proceso de vermicompostaje, ya que una elevada densidad traería consigo una competencia entre los individuos que ralentizaría el proceso (Domínguez, 1996). En condiciones naturales, la colonización está controlada directamente por la temperatura, humedad y disponibilidad de alimento dando como resultado una producción baja de biomasa. En cambio, en condiciones artificiales, las lombrices presentan una dinámica poblacional diferente debido al gran aporte de alimento y a que las condiciones ambientales suelen estar controladas. Observaciones sobre el crecimiento y reproducción de *E. fetida* y *E. andrei* han puesto de manifiesto que existe un mecanismo de autorregulación, por el cual la abundancia total de lombrices se estabiliza alrededor de un cierto número de individuos. A corto plazo se observa que el crecimiento y la tasa de reproductividad parecen estar asociados con la fase de colonización y, una vez finalizada esta fase, las literas tienden a superpoblarse. En este momento, disminuye la tasa productiva, apreciándose una disminución del tamaño de las lombrices, a pesar de la abundancia de alimento. La densidad de población es particularmente importante si lo que se pretende es obtener lombrices de tierra para fines como cebo de pesca, alimentación animal directa u obtención de

piensos, ya que si la densidad es alta los individuos alcanzan tamaños medios considerablemente inferiores (Domínguez, 2004).

I.3.4.6. ENEMIGOS DE LAS LOMBRICES

Aunque se considera que el hombre es el principal enemigo de la lombriz por el manejo incorrecto del proceso de vermicompostaje, otros vertebrados, como ratones, aves y topos, pueden constituir una amenaza para las lombrices. Sin embargo, éstos pueden controlarse con la implantación, sobre y debajo de las literas de lonas resistentes que impidan el paso de los depredadores. Existe un gran número de invertebrados que son depredadores o parásitos de las lombrices como hormigas, ácaros, tijeretas, ciempiés, etc. Las hormigas pueden llegar a establecerse en colonias de alta densidad, ocasionando daños considerables. Por lo general estos depredadores se suelen controlar manteniendo la humedad del sustrato por encima del 80% y un pH superior a 7. En los países tropicales la planaria (*Bipalium kewense*, Moseley) se puede considerar como la plaga de mayor importancia ya que se adhiere a la lombriz, alimentándose de su contenido interno hasta matarla. El control de esta plaga se realiza manteniendo el pH del material entre 7.5-8, ya que este platelminto se desarrolla y comienzan su actividad depredadora a pH ácidos.

I.3.5 CAMBIOS DURANTE LOS PROCESOS DE VERMICOMPOSTAJE

La acción combinada de lombrices y microorganismos modifica significativamente las características y composición de los residuos orgánicos. La biodegradación y estabilización de la materia orgánica se lleva a cabo en condiciones mesófilas y aeróbicas mantenidas por la acción de las lombrices. Por ello, en los procesos de vermicompostaje únicamente hay que mantener una adecuada humedad del material orgánico (mediante riego manual o por aspersión) y se evitan otros manejos como la aireación (manual o mediante maquinaria especializada) que encarece otros procesos como el del compostaje.

Durante el proceso de vermicompostaje, una fracción de la materia orgánica contenida en los residuos se mineraliza, por lo que los valores de carbono orgánico total disminuyen apreciablemente. El grado de disminución es variable (entre un 10 y un 55%) dependiendo fundamentalmente de la naturaleza del residuo orgánico, su biodegradabilidad, densidad de población de lombrices y duración del proceso. Comparativamente las hemicelulosas y celulosas se degradan más fácilmente que las ligninas, cuyo contenido se mantiene o aumenta durante el vermicompostaje (Elvira y col., 1995; Romero y col., 2006b). La materia orgánica residual tiende a humificarse, polimerizarse y policondensarse, particularmente durante las etapas finales del proceso. Debido a ello, los niveles de ácidos húmicos y en menor medida de ácidos fúlvicos en los productos finales del proceso de vermicompostaje aumentan (entre un 20-60% respecto a los registrados en los materiales de partida

y las características químicas y estructurales de los ácidos húmicos neoformados durante el proceso de vermicompostaje son similares a los del suelo natural (Elvira y col., 1999; Romero y col., 2006b).

En los últimos años, y de forma similar al proceso de compostaje, un gran interés han suscitado los estudios y el conocimiento sobre la evolución de diferentes actividades enzimáticas como biomarcadores de los procesos de vermicompostaje, con objeto de obtener información sobre de los cambios de los residuos orgánicos, así como del funcionamiento de los ciclos de elementos. En general, la mayoría de las actividades enzimáticas estudiadas (deshidrogenasa, proteasa, ureasa, β -glucosidasa, fosfatasa, etc), después de un aumento durante los primeros estadios del proceso, tienden a disminuir a medida que avanza la biodegradación de los residuos orgánicos por la acción de las lombrices y microorganismos (Benítez y col., 1999a,b, 2002). Por tal motivo, los vermicomposts obtenidos tendrán una menor actividad que los materiales orgánicos frescos. Sin embargo hay que señalar, que los vermicomposts, al tener estabilizada su materia orgánica, conseguirán mayor eficacia en la construcción de un pool enzimático "estable", es decir, complejos "enzima-humus" capaces de resistir la desnaturalización de los enzimas (Benítez y col., 2000a,b, 2005). Debido al conocimiento adquirido sobre la evolución de diferentes actividades enzimáticas durante el vermicompostaje, Benítez y col (1999a) han establecido un índice del potencial metabólico (actividad deshidrogenasa/ carbono soluble agua) de ese proceso, que ha permitido diferenciar dos fases en los procesos de vermicompostaje: una inicial hidrolítica y otra final de maduración (Figura I.22).

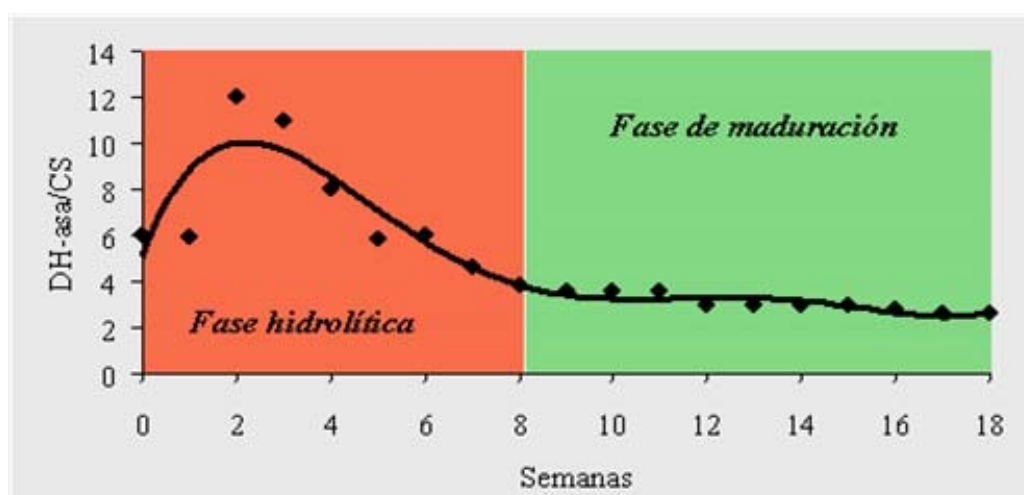


Figura I.22. Evolución del índice del potencial metabólico y fases del proceso de vermicompostaje de lodos residuales (Benítez y col., 1999).

La concentración de nutrientes de los residuos orgánicos tiende a aumentar durante el proceso de vermicompostaje. Estos aumentos son más apreciables para el fósforo, calcio, magnesio y micronutrientes y son atribuidos a un efecto de concentración de ellos, debido a la mineralización de la materia orgánica contenida en los residuos orgánicos. La dinámica del nitrógeno durante el

vermicompostaje es variable, observándose tanto aumentos como disminuciones. Los descensos se han registrados en residuos que inicialmente presentan una dosis inicial elevada de este nutriente, y se han atribuido al propio consumo por parte de las lombrices inoculadas, a procesos de desnitrificación, a pérdidas por volatilización de este elemento en forma de amonio, así como por lixiviación en el drenaje en algunos de estos sistemas de vermicompostaje (Nogales y col., 1999a, Atiyeh y col., 2000). Los aumentos, en cambio, están relacionados con un efecto de concentración del mismo, debido a la mineralización de la materia orgánica. (Elvira y col., 1998). La concentración de potasio tiende a disminuir durante el vermicompostaje debido, fundamentalmente, a una pérdida parcial de este elemento a través de las aguas de lixiviación que percolan en estos procesos (Elvira y col., 1998).

La concentración total de metales pesados (Cd, Ni, Cr, Pb, etc) presentes en algunos residuos orgánicos aumenta durante el vermicompostaje debido a la mineralización de la materia orgánica (Elvira y col., 1995). Sin embargo, las concentraciones de los metales pesados asimilables o extraíbles tiende a disminuir apreciablemente, consecuencia de la formación de complejos insolubles de elementos con los ácidos húmicos neoformados y fracciones orgánicas más polimerizadas (Domínguez, 2004). Respecto a los contaminantes orgánicos, el vermicompostaje se muestra como un proceso eficaz para reducir los niveles de ellos. Así, la elevada concentración de polifenoles que presentan los alperujos habían desaparecido después de 4 meses de biotransformación por lombrices y microorganismos (Saavedra y col., 2006).

I.3.6 VERMICOMPOSTAJE Y MICROORGANISMOS PATÓGENOS

El vermicompostaje, como el compostaje, conlleva una importante reducción de las poblaciones de microorganismos patógenos. En algunos trabajos se ha observado que después de 60 días de vermicompostaje, la cantidad de coliformes fecales en lodos de depuradora y en purines de cerdo cayó desde 39000 NMP (número más probable) hasta 0 NMP/g (Domínguez, 2004; Monroy, 2006). En el mismo período, *Salmonella spp* también sufrió una reducción drástica desde 5 NMP /g hasta <1 NMP/g, valor aceptado para compost por la EPA (Domínguez, 2004; Monroy, 2006). Otros resultados similares han sido presentados por Eastman (1999), también para coliformes fecales y *Salmonella*, así como para virus entéricos y huevos de platelmintos.

I.3.7. TIPOS DE SISTEMAS O PROCESOS DE VERMICOMPOSTAJE

Los procesos de vermicompostaje se pueden desarrollar a diferentes escalas, dependiendo fundamentalmente de los fines que se persigan. Básicamente se pueden establecer cuatro escalas:

I.3.7.1. PROCESOS A ESCALA DOMÉSTICA

El objetivo es utilizar como alimento para las lombrices los residuos de cocina y otros desperdicios que se originan en el propio hogar y emplear los productos finales (vermicompost y lombrices) en el huerto, jardín, macetas o en la alimentación de los animales domésticos. Únicamente se requiere de algunas cajas, cajones o cualquier recipiente de madera, plástico o metal que se pueda mantener dentro de la casa o en el patio. En el mercado existen una gran variedad de vermicompostadores domésticos de diferente diseño.

I.37.2. PROCESOS DE VERMICOMPOSTAJE A ESCALA PEQUEÑA O LABORATORIO.

Se suelen utilizar en laboratorios y centros de investigación. Su fin es dar información sobre las bases científicas del proceso del vermicompostaje y sobre la viabilidad de la utilización de nuevos residuos orgánicos, solos o mezclados con otros, para su uso como alimento para las lombrices. Las condiciones ambientales en estos procesos están controladas, manteniéndose constantes la humedad y temperatura y suelen ubicarse en cámaras especiales para este fin. Se utilizan contenedores, receptáculos y pequeños reactores abiertos o cerrados de diferente tamaño, dependiendo del tipo de experimentación a desarrollar.

I.37.3. PROCESOS DE VERMICOMPOSTAJE A ESCALA MEDIANA O PILOTO.

Se utiliza en áreas pequeñas y su objetivo fundamental es reciclar residuos de cosecha, estiércoles de animales o residuos agrícolas industriales, para obtener vermicompost y fertilizar sus cultivos. Su uso también está destinado a centros de investigación y, en este caso, tiene como objetivo optimizar los procesos de vermicompostaje a una mayor escala y en condiciones semicontroladas o sin controlar. Para ello se utilizan dispositivos de diferente tamaño, pequeñas literas), canteros, cuñas, lechos, reactores medianos

I.3.7.4. PROCESOS A ESCALA INDUSTRIAL.

Estos procesos tienen como finalidad la obtención y comercialización del vermicompost. En general estas unidades poseen en explotación más de 500 m² de literas de cultivo directo. Cuando en una unidad se ha llegado al límite de ampliación de literas (en los que se incorporan las lombrices que se van generando), se presenta lo que se conoce como sobrepoblación de estos animales. En este momento aparece la lombriz como un nuevo producto para su comercialización que puede ser viva, o previa transformación en forma de harina de lombriz. A esta escala, por lo general se requiere de la

mecanización del proceso. Para esta escala es necesario un diseño del campo, que, a modo de ejemplo debe contar de las siguientes áreas (Martínez y col., 2003):

a) Área de acondicionamiento: Zona donde se procede al acondicionamiento de los residuos orgánicos que posteriormente serán utilizados por las lombrices.

b) Área de literas: Las literas deben tener un ancho y largo que permitan la mecanización de los procesos de alimentación, riego y recogida del vermicompost.

c) Área de cría: Esta área constituye la reserva de lombrices en caso algún error en el manejo del proceso, que provoque la muerte de las lombrices ubicadas en las literas.

d) Área de almacenamiento: Es el área donde se lleva el vermicompost una vez recogido de las literas. Es recomendable que la misma sea ventilada y protegida de la lluvia. Bajo estas condiciones se reduce la humedad del vermicompost a un 30% mediante secado al aire y, posteriormente, se tamiza por diferentes medidas dependiendo del objetivo de su empleo, envasándose en caso necesario.

I.3.8. PRODUCTOS FINALES DEL PROCESO DE VERMICOMPOSTAJE

I.3.8.1. VERMICOMPOST- COMPOST DE LOMBRIZ-LUMBRICOMPOST-HUMUS DE LOMBRIZ

El vermicompost en sus diferentes acepciones se define como el producto final resultante del proceso de vermicompostaje, que presenta unas óptimas condiciones físicas, un contenido variable de materia orgánica parcialmente humificada, con contenidos variables de nutrientes y sustancias fitoregularoras del crecimiento y que puede ser almacenado sin posteriores tratamientos ni alteraciones. Según la legislación vigente (BOE, 2005), el vermicompost es el producto estabilizado obtenido a partir de materiales orgánicos, por digestión con lombrices, bajo condiciones controladas. Los contenidos mínimos en principios activos y nutrientes exigibles para el vermicompost son los siguientes: materia orgánica total: 40%; humedad: entre 30 y 40%; C/N: <20; el 90% de las partículas deben pasar por una malla de 25 mm.

Los vermicompost obtenidos han sido tradicionalmente empleados en agricultura, como enmiendas, abonos o fertilizantes orgánicos de suelos, así como sustratos de cultivos bajo cubierta. Los efectos positivos que ocasionan sobre la fertilidad física, química y biológica del suelo y sobre los rendimientos de cosecha de los cultivos son similares e incluso superiores a los que ocasiona el compost. Un breve resumen de la información existente, a través de la bibliografía consultada (Casalicchio y Graziano, 1987; Edwards y Burrows, 1988; Gallardo-Lara y Nogales, 1987; Hervás y col., 1989; Nogales y col., 1995, 1996; Petrussi y col., 1988; Tomati y col., 1987) relativa a los efectos que los vermicomposts sobre el suelo y la planta se expone a continuación:

1. Presencia de elevados contenidos en materia orgánica en los vermicomposts (entre 20-60%), parte de la cual se encuentra parcialmente humificada (ácidos húmicos y fúlvicos). El carácter coloidal

de estos materiales y su baja densidad influyen positivamente sobre las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo provocando los siguientes efectos:

- Mejoran la estructura del medio edáfico, al aumentar la formación y estabilidad de los agregados del suelo, permitiendo una mayor resistencia a los procesos de erosión.
- Reducen la densidad aparente y aumentan el tamaño de los poros del suelo, lo que favorece la penetración de agua y la permeabilidad del aire, estimulando de esta forma el crecimiento del sistema radicular de las plantas.
- Aumentan la capacidad de retención de agua, favoreciendo la resistencia de los suelos a los periodos de sequía.
- Aumentan la capacidad de intercambio catiónico del suelo.
- Favorecen un aumento del pH en los suelos ácidos y una disminución del mismo en los suelos alcalinos. La capacidad tampón (buffer) de los vermicompost impide por una parte, la movilización de metales pesados en suelos ácidos y por otra, aumenta la asimilabilidad de nutrientes en suelos alcalinos.
- Aumenta los niveles de materia orgánica total y humificada del suelo, lo que favorece el incremento de su actividad biológica, debido al aumento del número de microorganismos (totales y funcionales) y de la actividad bioquímica.
- Las sustancias húmicas afectan a la permeabilidad de membrana, facilitando el transporte de elementos esenciales dentro de la raíz mediante la activación de proteínas carrier. Asimismo, las moléculas húmicas del terreno crean un microambiente idóneo para la proliferación de numerosos microorganismos, ya que contribuyen a sostener energéticamente el sistema, filtrando y neutralizando las sustancias tóxicas (Ceccanti y col. 1997).

2. Los vermicomposts de residuos orgánicos contienen nutrientes a concentraciones variables. Por lo general, estos materiales presentan niveles de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio, respectivamente 5, 7, 11, 1,5, y 3 veces superiores a los registrados en suelos de cultivo. Y por tanto su aplicación al suelo aumenta los niveles totales y asimilables de estos elementos en el medio edáfico, lo que se traduce en un aumento de los mismos en los cultivos.

3. Los vermicomposts pueden presentar concentraciones elevadas de micronutrientes esenciales para la planta (Fe, Mn, Cu, Zn, B), por lo que su aplicación agronómica produce aumentos de estos tanto en el suelo como en la planta.

4. También presentan sustancias con carácter fitohormonal, de esta manera estimulan el crecimiento de los cultivos.

En los últimos años, han suscitado un gran interés científico el uso de los vermicomposts para otros fines distintos a los que tradicionalmente habían sido empleados, debido a capacidades específicas que ellos poseen cuando se incorporan en el suelo. El conocimiento existente sobre estas capacidades todavía es limitado pero entre otras se han podido observar las siguientes: a) capacidad para reducir hongos patogénicos que ocasionan podredumbre y necrosis radicular de plantas

cultivadas (Lorite y col., 2005), b) capacidad para modificar la extractabilidad de metales pesados en suelos contaminados y residuos mineros, evitando su transferencia a plantas y acuíferos subterráneos (Nogales y Benítez., 2006) c) capacidad para modificar el comportamiento (adsorción, degradación) de plaguicidas en suelos (Fernandez-Bayo y col., 2006); d) capacidad para ser utilizados como bioadsorbentes de plaguicidas (Romero y col., 2006a), e) capacidad para regenerar suelos degradados (Benítez y col., 2004).

I.3.8.2. LOMBRICES DE TIERRA

Como resultado del proceso de vermicompostaje se producen periódicamente excedentes de lombrices. Estas lombrices pueden constituir una fuente adicional de ingresos en estos procesos, ya que vivas o transformándolas en harina, pueden ser utilizadas para la alimentación animal. El agua es el principal componente de la lombriz (alrededor del 85-90% de su peso total); el resto está constituido mayoritariamente por proteínas, así como por carbohidratos, grasas y elementos minerales. El porcentaje de cada uno de ellos, sobre materia seca es el siguiente: 70-82 % proteínas, 7-10% grasa, 8-20% carbohidratos y 2-3% minerales. La proteína de la lombriz contiene todos los aminoácidos esenciales, los cuales se encuentran bien balanceados y a niveles superiores a los registrados en la proteína de pescado y vacuna (Edwards y Bohlen, 1996). La harina de lombriz, que tiene un alto valor proteico, se utiliza en el ámbito industrial, en la elaboración de piensos bien balanceados para alimentación de vacas, cerdos, gallinas, pollos, etc. Se ha comprobado que los piensos enriquecidos con harina de lombriz logran mejores resultados en la alimentación animal que los balanceados con otras proteínas, reduciéndose los costos de producción entre un 20 y 40 %,

I.3.8.3. LIXIVIADOS DE LOS PROCESOS DE VERMICOMPOSTAJE

En algunos procesos de vermicompostaje, el exceso de agua adicionada a los sustratos orgánicos para mantener las condiciones óptimas de humedad, percola de las literas, siendo recogida en contenedores. Estos lixiviados contienen concentraciones variables materia orgánica disuelta macro y micronutrientes. En relación a ello, Benítez y col. (1995) observaron que la aplicación al suelo de lixiviados de un proceso de vermicompostaje utilizando estiércol vacuno aumentaron los rendimientos de cosecha de un cultivo de espinaca, suministrando adecuadamente N, P y sobre todo K a ese cultivo. El uso de los lixiviados de los procesos de vermicompostaje todavía es muy escaso, y en algún caso habría que tener precaución debido a que pueden contener compuestos orgánicos tóxicos si, sobre todo, se utilizan residuos orgánicos procedentes del sector urbano o industrial.

I.4. BIOTRANSFORMACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS



I.4.1. GENERALIDADES

La biotransformación de un sustrato implica una serie de reacciones bioquímicas, químicas y físico-químicas, estando los procesos bioquímicos en directa relación con el tipo de organismo o microorganismo presente en ese sustrato. Es bien conocido que todas las reacciones bioquímicas están catalizadas por enzimas, que son proteínas que poseen propiedades catalíticas debido a su poder de activación específica. Las enzimas son específicas para el tipo de reacción en las que participan, es decir, son específicas para un determinado sustrato.

Por muchas razones los hongos del Género de *Pleurotus* han sido estudiados en el mundo, debido a que ellos tienen un alto valor gastronómico, y además son capaces de colonizar y degradar una gran variedad de residuos lignocelulósicos. Ellos requieren un tiempo de crecimiento más corto cuando se comparan con los champiñones comestibles, demandan poco control medioambiental, sus cuerpos fructíferos no son muy a menudo atacados por enfermedades y patógenos, y pueden cultivarse de una manera simple y económica (Jwanny y col, 1995; Patrabansh y Madan, 1997).

El hongo *P. ostreatus* es un descomponedor primario de madera, paja y residuos vegetales (Zadrazil y Kurtzman, 1981) (Figura I. 23). En

muchas investigaciones se ha propuesto el empleo de hongos de pudrición blanca, como alternativa para la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes (Higson FK, 1991; Eggen T, 2000). La aceptación creciente de estos organismos en procesos de tratamiento y/o biorremediación se debe a que los hongos de pudrición blanca poseen un sistema



Figura 1.23. Paja biodegradada por *P.ostreatus*

enzimático extracelular de carácter no específico, capaz de romper una gran cantidad de enlaces diferentes y, por lo tanto, de degradar una gran variedad de compuestos orgánicos (Rodríguez y col, 2003). Platt y col (1984) plantean que existe un complejo enzimático en ciertos hongos del Género *Pleurotus* que incluye las siguientes enzimas: lacasa, β -glucosidasa y otras involucradas en la degradación de la celulosa y lignina.

I.4.2. LACASA

La lacasa (Figura I.24) es una fenoloxidasa que cataliza la reducción de los cuatro electrones del oxígeno a agua, y se acompaña por la oxidación del sustrato fenólico (Thurston, 1994).

La lacasa extracelular fúngica pertenecen a un grupo de oxidasas que contienen cobre y que son capaces de oxidar fenoles orto, meta y para-sustituídos, incluyendo monofenoles, polifenoles, fenoles metoxi sustituidos, aminofenoles y fenilendiamina, pero

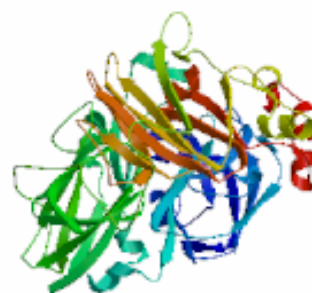
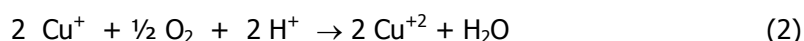
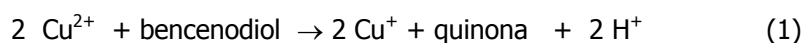


Figura I.24. Modelo de la enzima lacasa

no tirosina (Thurston, 1994; Yaropolov y col., 1994). Es la causante de la podredumbre blanca que degrada la lignina fenólica y no fenólica, produciendo ácidos aromáticos (Buswell y Odier, 1987). Esta enzima ha sido empleada también en la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) y pesticidas (Eggen, 2000; Bending y col, 2002) y en la valoración de hidrolizados lignocelulósicos (Jönsson y col, 1998). En forma inmovilizada se ha utilizado para remover compuestos xenobióticos de residuos acuosos (Shüitzendüel y col, 1999; Crecchio y col, 1995), y en la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos (Kersten y col, 1990).

La lacasa (EC 1.10.3.2) es una oxidasa azul capaz de oxidar fenoles y aminas aromáticas con reducción de oxígeno molecular a agua mediante un sistema multicúprico. El centro catalítico consiste en tres tipos de cobre con diferentes funciones: tipo 1 (cobre azul) cataliza la transferencia de electrones, tipo 2 activa el oxígeno molecular y tipo 3, un cobre dímero, es responsable de la captación de oxígeno (Kaim y Schwederski, 1991). El modelo de reacción molecular de Latour [1988] y Yaropolov y col. [1994] se puede simplificar a la siguiente ecuación:



En muchos casos la oxidación de los sustratos mediante lacasa finalmente lleva a la polimerización de los productos a través del acoplamiento oxidativo. Los productos de las reacciones de acoplamiento oxidativo se originan en los acoplamientos C-O y C-C de los reactantes fenólicos y del acoplamiento N-N y C-N de las aminas aromáticas (Sjoblad y Bollag, 1981). Esta reacción es generalmente vista como una detoxificación de contaminantes fenólicos (Dec y Bollag, 1990; Bollag y col., 1988; Nannipieri y Bollag, 1991).

Dado que los hongos filamentosos presentan una pared celular rígida exterior a la membrana plasmática, las enzimas hidrolíticas deben ser secretadas al exterior de la célula, donde degradan los polímeros (lignina y celulosa) para dar lugar a compuestos de bajo peso molecular que puedan ser absorbidos. La secreción de enzimas por hongos filamentosos es un proceso muy relacionado con el crecimiento. Y al igual que éste, la secreción está localizada exclusivamente en los ápices de las hifas (Iriarte, 2003).

La producción de lacasa está directamente relacionada con la cantidad de biomasa producida, (Das y col., 1997). En contraste con otros hongos ligninolíticos en los que la actividad ligninolítica se expresa e incrementa en concentraciones limitantes de nutrientes en el cultivo, (ej. las actividades lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*), en *Pleurotus* la lacasa no es regulada por condiciones limitantes de nutrientes, pues cantidades suficientes o en exceso de éstos estimulan esta actividad y la producción de biomasa. Similar comportamiento de la actividad lacasa ha sido evidenciado en estudios con hongos de pudrición blanca productores de lacasa-manganeso peroxidasa (Kerem y col., 1992).

I.4.3. β -GLUCOSIDASA

La β -Glucosidasa (EC 3.2.1.21; β -D-glucosido glucohidrolasa; celobiasa; *p*-nitrofenil β -glucosidasa; β -1,6-glucosidasa) (Figura 1.25), está involucrada en el desarrollo del ciclo del carbono en suelos, puesto que se encarga de catalizar reacciones de hidrólisis de finales de cadenas no reducibles de β -D-glucosidos para formar β -glucosa. Esta enzima, por tanto, podrá reflejar el estado de la materia orgánica en un sustrato biodegradado y todos los procesos que tengan lugar en ella, desde la mineralización hasta la humificación (García y col., 1994b).



Figura I.25. Modelo de la enzima β -Glucosidasa

La β -Glucosidasa también juega un papel importante en la descomposición de los sustratos lignocelulósicos catalizando la hidrólisis del alkyl- y aryl- β -glucosidos, diglucosidos y oligosacáridos. El papel principal de la β -glucosidasa en la sacarificación de la celulosa es la degradación de la celobiosa, un inhibidor de las enzimas depolimerizadoras, y celo-oligosacáridos a glucosa (Lymar y col., 1995). En consecuencia esta enzima tiene amplia especificidad para β -D-glucósidos. Algunos ejemplos de las sustancias que hidroliza: β -D-galactosidos, α -L-arabinosidos, β -D-xylosidos, β -D-fucosidos.

Su distribución en la naturaleza es bastante amplia estando presente tanto en plantas como en microorganismos, e interviniendo en la descomposición de residuos vegetales en los suelos (Hayano y Tubaki, 1985). La actividad β -glucosidasa encontrada en el suelo por Hayano y Katami (1977), en cuanto a especificidad de sustrato y pH óptimo, era similar a la determinada en algunos hongos, lo que parece confirmar que dicha enzima puede tener un origen predominantemente fúngico (Hattori, 1988). Esta enzima es bastante sensible a la presencia de metales pesados y otros contaminantes que pueden acompañar a los residuos orgánicos (Eivazi y Zakaria, 1993). Por tanto, la determinación de la actividad β -glucosidasa no es sólo importante por hacer referencia cualitativa del estado de descomposición en que se encuentra la materia orgánica, sino que es capaz de ser un biomarcador del estado de contaminación de un suelo.

I.4.4. DEGRADACIÓN DE CELULOSA

La celulosa es un polímero de unidades de glucosa, en que sus unidades se encuentran unidas por enlaces β 1-4, en consecuencia se dice que consta de unidades de β -D-glucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos. La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals (Schlegel, 1993).

La celulolisis es catalizada por un sistema constituido por tres enzimas: endo- β -1,4-glucanasa que ataca los enlaces β -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos), exo- β -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde

los extremos de la molécula, y β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (Muller, 1988).

En los suelos bien aireados la celulosa es degradada y utilizada por varios microorganismos aerobios: hongos, mixobacterias y otras eubacterias (Schlegel, 1993). Los hongos tienen más éxito que las bacterias durante la celulolisis en los suelos ácidos o en la madera (lignocelulosa). Excretan celulasas que pueden ser aisladas del medio de cultivo así como del micelio. Las bacterias deslizantes y las mixobacterias no excretan celulasas al medio, pero se adhieren a las fibras de celulosa para digerirlas. En los ambientes anaeróbicos la celulosa es degradada por eubacterias meso y termofílicas. La digestión de la celulosa por diversas bacterias está acompañada de la secreción de una sustancia carotenoide amarilla que sirve como indicador de la hidrólisis (Schlegel, 1993). Algunos microorganismos que digieren celulosa se exponen en la tabla I.2.

Tabla I.2. Algunos microorganismos que digieren celulosa (Schlegel, 1993; Shoham y col., 1999)

<u>Organismos eucarióticos</u>				
Quitridiomicetos	Hongos mitospóricos	Ascomicetos	Basidiomicetos	
<i>Neocallimastix</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Coprinus</i>	
<i>Orpinomyces</i>	<i>Botrytis</i>		<i>Fomes</i>	
<i>Piromonas</i>	<i>Fusarium</i>		<i>Pleurotus</i>	
<i>Sphaeromonas</i>	<i>Humicola</i>		<i>Polyporus</i>	
	<i>Myrothecium</i>		<i>Trametes</i>	
	<i>Trichoderma</i>		<i>Rhizoctonia</i>	
<u>Organismos procarióticos</u>				
Mixobacterias	Bacterias deslizantes	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Actinomicetos
<i>Archangium</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Polyangium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Sorangium</i>			<i>Clostridium</i>	<i>Streptosporangium</i>
			<i>Eubacterium</i>	
			<i>Ruminococcus</i>	

Los principales factores ambientales que afectan la descomposición de la celulosa en el suelo son el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, la aireación, la humedad, el pH, la presencia de otros glúcidos y la proporción de lignina en los restos vegetales (Alexander, 1980).

La celulolisis puede producirse en un amplio rango de temperatura, de 5 a 65°C. Entre los microorganismos termófilos se encuentran *Clostridium*, *Streptomyces*, *Chaetomium*, *Humicola*, presentes en el estiércol y los vegetales en descomposición. Los microorganismos celulolíticos del suelo son principalmente mesófilos. Una humedad por debajo del 50 al 60% de la capacidad de campo favorece a las formas filamentosas. En un suelo anegado la degradación se debe a las bacterias anaerobias. Los actinomicetos persisten a un 20% de la capacidad de campo.

En suelos con pH 6,5 - 7,5 se encuentra *Cellulomonas*, a pH 5,7 - 6,2 aún desarrolla *Cytophaga* y si la acidez desciende predominan los hongos. Se pueden encontrar bacterias celulolíticas anaerobias también en suelos ácidos con pH 4,3. Las mixobacterias son las más sensibles a la acidez por lo que se las encuentra en el mantillo de huertos, en suelos abonados y en los ricos en calcio. Los actinomicetos se hallan en suelos muy diversos, entre pH 4,6 y 9,5. Al tratar el suelo con cal cambia la composición de la microbiota activa (Alexander, 1980).

La influencia de la salinidad suele encontrarse en la naturaleza enmascarada por los otros factores. En el horizonte A de los suelos halomorfos hay mayor diversidad de organismos, mientras que en el horizonte B por la acumulación de las sales se hallan solamente hongos halotolerantes (Dommergues y col., 1970).

Las sustancias con las que está asociada la celulosa en los desechos vegetales influyen sobre la velocidad de la descomposición. La degradación de 30 g de celulosa, de los cuales 20 a 30% sirven para la síntesis microbiana, exige la provisión de 1 g de nitrógeno. Cuando la presencia de lignina hace más lenta la celulolisis se requiere menos cantidad de nitrógeno, porque éste poco a poco es reciclado. Para los hongos que hidrolizan lignina y celulosa la relación C/N es mayor que 300. Los nitratos favorecen la actividad de las bacterias mientras que el amonio y los aminoácidos son mejor utilizados por las mixobacterias y los hongos. *Azotobacter* y otros organismos que fijan nitrógeno atmosférico junto a las bacterias solubilizadoras de fosfatos, favorecen la celulolisis (Dommergues y col., 1970). La aplicación de nitratos, amonio, urea y estiércol elevan la velocidad de la descomposición (Alexander, 1980).

I.4.5. DEGRADACIÓN DE LIGNINA

El contenido en lignina del tejido leñoso varía entre 18 y 30% del peso seco. Está ubicada en la lámina secundaria de las paredes celulares y es el componente de las plantas degradado más lentamente. No es químicamente uniforme y tiene una estructura muy compleja (Alexander, 1980).

Los monómeros de la lignina son todos derivados del fenilpropano, principalmente alcohol coniferilo. La complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros (Figura I.26). Las diferencias en la composición de la ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto, 14% en gramíneas (Schlegel, 1993). Las unidades fenilpropano están entrecruzadas por múltiples enlaces éter y C-C, que son extremadamente resistentes al ataque enzimático. La lignina es un producto final inerte del metabolismo vegetal y solamente es degradada por microorganismos (Dommergues y col., 1970).

Dos grupos de hongos se distinguen entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosas dejando la lignina como residuo, y los que provocan la podredumbre blanca que degradan lignina. Entre estos últimos se encuentran *Stereum*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Polyporus*, *Xylaria* (Carrillo, 2003).

La degradación de lignina ocurre en presencia de oxígeno y glucosa. El sistema enzimático contiene peroxidasas que catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces β -O-4 éter y los C-C de la lignina y requieren H_2O_2 proveniente de la oxidación por la glucosa-oxidasa. La formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina parece tener como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera. Sobre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular liberados actúan luego las fenoloxidasas (Carrillo, 2003).

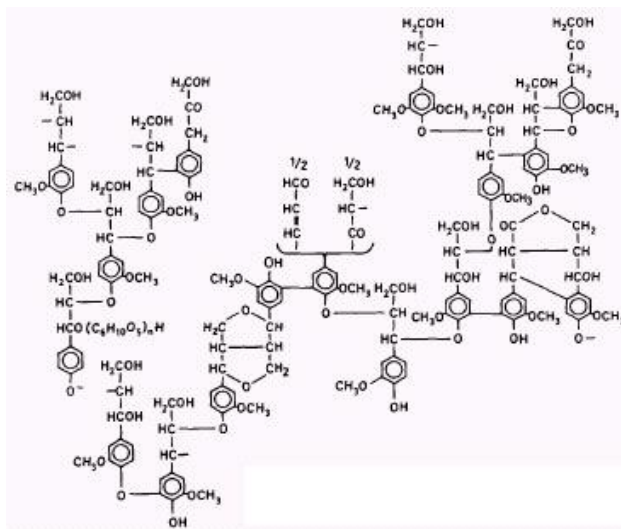
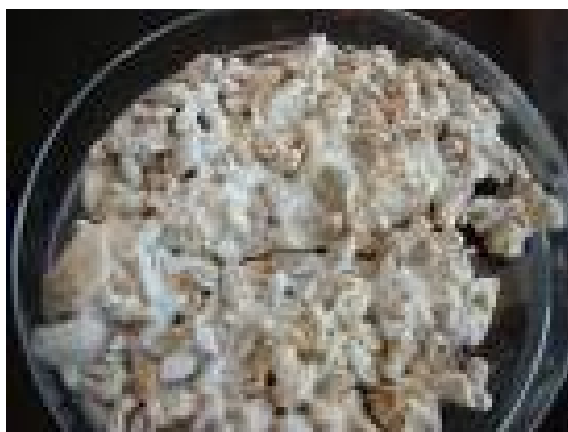


Figura I.26. Esquema de la molécula de lignina (Alexander, 1980).

II. BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO NATURAL POR HONGOS DE LA ESPECIE *PLEUROTUS OSTREATUS*



II.1. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1.1. MATERIALES

- Alperujo u orujo procedente de la extracción del aceite de oliva mediante proceso de centrifugación por dos fases suministrado por la empresa Romeroliva, Deifontes, Granada.
- Cepa de *Pleurotus ostreatus* de la empresa Amycel (# 3020 dsv7240), la cual se sembró en Agar PDA en placa de Petri a 25 °C en oscuridad durante 15 días hasta obtener el micelio joven requerido para preparar el inóculo.

II.1.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para la obtención del inóculo se tomaron muestras de 500 gramos de trigo, que después de su ebullición en agua durante 15 minutos, drenaje y enfriamiento, fueron secadas al aire en una superficie adsorbente. Posteriormente cada muestra fue mezclada con 1,75 g de CaCO₃ y 6,3 g de yeso, colocándose en frasco de vidrio, siendo esterilizado a 121°C durante 30 minutos. Una vez frío, la muestra fue sembrada en campana de flujo laminar, con un trozo de micelio joven de *P.ostreatus*, de 1cm x 1cm, proveniente del inóculo obtenido en placa de Petri y se incubó, durante dos semanas a 25 °C y en oscuridad hasta que el micelio cubrió completamente esta muestra.

II.1.3. PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE ALPERUJO

Un kilogramo (peso seco) de alperujo, por triplicado, fue colocado en bolsa transparente de polietileno previamente esterilizada. Cada bolsa conteniendo el alperujo fue suplementada con 1 % de CaCO₃ (p.s.) y 2% de harina de maíz, siendo esterilizadas a 120 °C durante 30 minutos y luego enfriadas. Posteriormente, el alperujo fue inoculado con el micelio del hongo *P. ostreatus* contenido en el sustrato de trigo, en una cantidad equivalente al 6 % (p.s.) y humedecido a un 80% con una solución tampón de fosfato pH 6. El alperujo inoculado fue incubado durante 4 meses, en cámara oscura controlada a 25°C. Transcurrido ese período y una vez que el alperujo había sido colonizado completamente por el hongo *Pleurotus*, el producto final degradado (Alperujo degradado por *Pleurotus ostreatus*) fue retirado de las bolsas. Una parte de este sustrato fue secado al aire y guardado en bolsa para su análisis químico y fitotóxico. La otra parte del sustrato fue guardada en bolsas a 4°C para su posterior análisis enzimático. Ello mismo tuvo lugar con el alperujo inicial.

II.1.4. METODOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DEL ALPERUJO NATURAL Y DEL ALPERUJO DEGRADADO CON *P. OSTREATUS*

II.1.4.1. pH (M.A.P.A., 1986)

Medido en el extracto acuoso en una relación sustrato orgánico:agua (1:25) con un pHmetro Beckman Mod. SS-2, después de ser sometido a agitación durante 30 minutos.

II.1.4.2. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (M.A.P.A., 1986)

Medida en extracto de pasta de saturación del material orgánico mediante empleo de conductivímetro Crison Mod. 525.

II.1.4.3. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (M.A.P.A., 1986)

Se realizó en un analizador de carbono total modelo Primacs-SC por detección de C mediante infrarrojos. El análisis de carbono total se realiza por combustión total de la muestra y el de carbono inorgánico total por oxidación con ácido fosfórico. El carbono orgánico total (COT) se obtiene por diferencia de ambos.

II.1.4.4. CARBONO HIDROSOLUBLE

La extracción del carbono hidrosoluble se realiza por agitación de la muestra orgánica con agua destilada (1:10) (p/v) a 60°C durante 1 hora (Benítez y col., 1999). El carbono se determina por oxidación con dicromato potásico en presencia de ácido sulfúrico en bloque digestor (150°C) durante 15-30 minutos y se mide en espectrofotómetro a una longitud de onda $\lambda=590$ nm (García y col., 1994b).

II.1.4.5. CARBONO EXTRAÍBLE TOTAL, ACIDOS HÚMICOS Y ÁCIDOS FÚLVICOS

La extracción de las sustancias húmicas se realizó mediante una solución 0,1 M de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a pH 7.1, para lo cual 10 g de los sustratos orgánicos se agitan durante 24 h a 37°C con 30 mL de la solución extractante, posterior centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos y filtración del sobrenadante con filtro tamaño de poro de 0,45 μm . A continuación, el extracto fue dializado con una membrana de diálisis MWCO: 12-14000 daltons, a 4°C, con cambio diario del agua destilada del recipiente hasta que el pH de ésta permaneció constante (Benítez y col., 2000a).

El fraccionamiento del carbono extraíble total se realizó por acidificación del extracto a pH 2.4 con ácido sulfúrico, centrifugación a 5000 rpm durante 15' y separación del precipitado (ácidos húmicos; AH) del sobrenadante (ácidos fúlvicos; AF).

El carbono contenido en el extracto (carbono extraíble total, CET) así como el de las distintas fracciones obtenidas (AH, AF) se determinó mediante oxidación ácida con dicromato puro y posterior valoración en espectrofotómetro Shimadzu UV Mod. 684 a una longitud de onda $\lambda=594$ nm.

II.1.4.6. POLIFENOLES TOTALES EXTRACTABLES (Clifford & Ramírez-Martínez 1991b; Khazaal y col., 1994)

Para la determinación de los polifenoles totales extractables, se pesaron alícuotas de 200 mg de los substratos iniciales y productos finales finamente molidas, añadiéndose 10 ml de una solución de acetona y agua en la proporción 1:1, acidificada mediante la adición de un 5% (V/V) de ácido fórmico. El tubo que contiene la muestra fue introducido en sonificador que contenía hielo durante 15 minutos y posteriormente, agitado en rueda mezcladora durante 24 horas a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 1.400 g a 4°C durante 30 minutos. El contenido del tubo se filtró en cámara fría (4°C), a través de papel Whatman, y el extracto fue guardado a 4°C.

De cada extracto se tomó una alícuota (50 µL para alperujo natural y 300 µL para alperujo degradado), llevándose hasta 1 mL con agua fría. Para elaborar la curva patrón, se prepararon soluciones conteniendo de 1 a 9 ml de una solución madre de de ácido caféico, 0,5 g/l de solvente, y se llevaron hasta 100 ml con agua destilada. A 1 ml de las distintas soluciones patrón, así como de las soluciones problema, se adicionaron 0,5 ml de reactivo de Folin Ciocalteu y 2,5 ml de una solución de Na₂CO₃ al 20% (P/V). A continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 35 minutos y se centrifugó a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos. La lectura se realizó midiendo la absorbancia frente a un blanco en espectrofotómetro a 755 nm.

II.1.4.7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

II.1.4.7.1. ACTIVIDAD DESHIDROGENASA (García y col., 1997)

Para la determinación de la actividad deshidrogenasa, a 0.2 g del sustrato orgánico se le añaden 0.2 mL de INT (iodofenil-3 p-nitrofenil-5 tetrazolium cloruro) al 0.4 % (p/v). Posteriormente se deja incubar durante 20 horas a 25° C en oscuridad. Transcurrido este tiempo el producto de la reacción INTF (iodonitrotetrazolium formazan) se extrae con una mezcla de acetona:tetracloroetileno (2:3) y se mide en espectrofotómetro a longitud de onda $\lambda = 490$ nm. Éste método es una combinación de 2 métodos anteriores (Benfield y col, 1977; Trevors, 1984). Los resultados se expresan como $\mu\text{g INTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

II.1.4.7.2. ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA

Para la determinación de la actividad β - glucosidasa, a 0.2 g de sustrato orgánico, se le añaden 0.5 ml de sustrato PNG (4-nitrofenil β -D-glucopiranoside) 0.05 M y 2 ml de tampón maleato 0.1 M pH 6.5 (Tabatabai, 1994). A continuación se incubaba a 37°C durante 2 horas y posteriormente se extrae el producto de la reacción PNP (*p*-nitrofenol) con NaOH 0.5 M y CaCl₂ 0.5 M. Finalmente, el PNP producido se mide en espectrofotómetro a una longitud de onda $\lambda = 398$ nm (Nannipieri et al. 1982). Los resultados se expresan como $\text{mg PNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

II.1.4.7.3. ACTIVIDAD FOSFATASA

Para la determinación de la actividad fosfatasa se toma 0.2 g de sustrato orgánico y se le añaden 0,5 ml de *p*-nitrofenilfosfato 0.115 M y 2 ml de tampón maleato 0.1 M pH 6.5, posteriormente se incuba a 37° C durante 2 horas (Tabatabai, 1994). A continuación se extrae el producto de la reacción PNP (*p*-nitrofenol) con NaOH 0.5 M y CaCl₂ 0.5 M y se mide en espectrofotómetro a longitud de onda $\lambda=398$ nm (Nannipieri et al. 1982).. Los resultados se expresaron como mg PNP g⁻¹h⁻¹.

II.1.4.7.4 ACTIVIDAD UREASA (García y col., 1993b)

Para la determinación de la actividad ureasa, a 0.1 g de material orgánico se le añaden 0,5 mL de urea al 6.4 % y 2 mL de tampón fosfato 0.1 M pH 7.1, se incuba a 37 °C durante 2 horas. Una vez concluido el periodo de incubación se detiene la reacción enfriando las muestras a 4°C durante 10 minutos y añadiendo agua destilada hasta un volumen de 10 mL. El amonio producido en la reacción se termina mediante electrodo selectivo de amonio (ORION Mod. 95-12). Los resultados se expresan como $\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$.

II.1.4.7.5. ACTIVIDAD LACASA

Para el análisis de la actividad lacasa, a 5 g de alperujo natural o alperujo degradado con *P. ostreatus* se le añade, en tubo de extracción de 50 ml, 25 ml de una solución buffer de fosfato a pH 6.0. La mezcla es agitada en rueda mezcladora durante 24 h, y posteriormente centrifugada a 3000 rpm. El contenido del tubo se filtra a través de papel Whatman, guardándose el extracto a 4°C.

La actividad lacasa de cada extracto fue determinada utilizando dos métodos analíticos, los cuales tuvieron que ser modificados y optimizados en función del tipo de los materiales orgánicos oleícolas ensayados:

a) Actividad enzimática de lacasa usando siringaldazina (Acros Organics, New Jersey, USA) como sustrato cromogénico (Chefetz et al., 1998). La mezcla reactiva (3 ml) estuvo compuesta por 2.5 ml de 0.22 mM siringaldazina, 0,3 ml de solución buffer de fosfato de sodio (pH 6,0) y 0,2 ml del extracto. Se prepararon blancos constituidos por 0,2 ml del extracto y 2,8 ml de la solución buffer de fosfato de sodio (pH 6,0). La actividad lacasa se mide monitoreando la absorbancia a 530nm durante un periodo de incubación de la muestra reactiva de 5 minutos. La cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato o genera 1 μmol de producto por minuto se toma como unidad de actividad enzimática ($U= \mu\text{mol min}^{-1}$).

b) Actividad enzimática de lacasa usando ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid, Acros Organics, New Jersey, USA) como sustrato (Childs & Bardsley, 1975). La mezcla reactiva (3 ml) estuvo compuesta por 0,95 ml de 0,5 mM ABTS, 1,85 ml de solución buffer de acetato de sodio

(pH 4,5) y 0,2 ml del extracto. Los blancos equeridos se prepararon con 2,8 ml de solución buffer de acetato de sodio (pH 4,5) y 0,2 ml del extracto. La actividad lacasa se mide monitoreando la absorbancia a 436 nm durante un periodo de incubación de la muestra reactiva de 5 minutos. La cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato o genera 1 μmol de producto por minuto se toma como unidad de actividad enzimática ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$).

II.1.4.7.6. ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDASA

La actividad Manganeso Peroxidasa (MnP) fue medida mediante la dimerización oxidativa del 2,6 – Dimetilfenol (2,6-DMP) según el método de Heinzkill et al. 1998, modificado y optimizado para los materiales orgánicos oleícolas ensayados. La mezcla reactiva estuvo constituida por 0,5 mL de 2,6-DMP 1mM (pH 4,5), 1,8 ml de solución buffer de malonato de sodio (pH 4,5), 0,490 ml de MnSO_4 0,7 mM, 0,010 ml de de una solución de H_2O_2 10 mM y 0,2 ml del extracto obtenido en la metodología de la actividad lacasa (II. 4.7.5). Los blancos estuvieron constituidos por los mismos componentes, excepto los 0,5 mM de 2,6-DMP 1mM. La actividad Manganeso peroxidasa se mide monitoreando la absorbancia a 469 nm durante un periodo de incubación de la muestra reactiva de 2 minutos. Esta actividad fue corregida por la actividad lacasa (0,2 ml del extracto, 2,3 ml de solución buffer malonato de sodio (pH 4,5) y 0,5 ml de 2,6-DMP 1mM (pH 4,5) y medida durante 2 minutos a una absorbancia de 469 nm) con la cual se correlaciona. Ambas actividades enzimáticas fueron expresadas como unidades por mililitro, donde 1 U fue definido como 1 μmol de sustrato oxidado por minuto

II.1.4.8. ANALISIS ELEMENTAL

II.1.4.8.1. NITRÓGENO KJELDAHL TOTAL (JACKSON, 1970)

Se utilizó una variante de la técnica Kjeldahl mediante la cual las muestras orgánicas se digieren con ácido sulfúrico y catalizadores que facilitan la transformación del nitrógeno en ión amonio, el cual posteriormente es destilado en medio alcalino y valorado.

II.1.4.8.2. ANÁLISIS DE OTROS ELEMENTOS

II.1.4.8.2.1. MINERALIZACIÓN NÍTRICO-PERCLÓRICA DE LAS MUESTRAS (AOAC, 1984)

La mineralización se realizó añadiendo 10 ml de $\text{NO}_3\text{H-CIO}_4\text{H}$ a 0.5 g de muestra orgánica. La digestión se lleva a cabo en un baño de arena a 200°C hasta que desaparecen los vapores nitrosos y de CIO_4H . Una vez frío, se añaden 10 ml de ClH y se calienta durante 1 hora a 200°C. El mineralizado se llevó a 50 ml.

II.1.4.8.2.2. FÓSFORO TOTAL DEL MINERALIZADO (C.I.I., 1969)

Por medio de la formación del complejo con el reactivo nitrovanadatomoilbídico y medida con espectrofotómetro Shimadzu UV Mod. 680 a una longitud de onda de 430 nm.

II.1. 4.8.2.3. POTASIO TOTAL DEL MINERALIZADO (C.I.I., 1969)

Medida directa sobre el mineralizado mediante fotómetro de llama Corning Mod. 400.

II.1.4.8.2.4. CALCIO, MAGNESIO, HIERRO, MANGANESO, COBRE Y ZINC DEL MINERALIZADO.

Determinación directa de todos los elementos en el mineralizado mediante espectrofotómetro de absorción atómica GBC 932 plus.

II.1.4.9. ANÁLISIS DE LA FITOTOXICIDAD (Zucconi y col., 1981a)

El test de fitotoxicidad se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Zucconi y col. (1981a, b) modificada, mediante la cual se realiza un ensayo de germinación "in vitro" de semillas de *Lepidium sativum* L., comúnmente denominado "berro de agua". En primer lugar se obtuvo un extracto acuoso de los materiales orgánica, tanto de los sustratos iniciales (I) como de los productos finales (F), (1:10) (p/v) manteniendo la suspensión en agitación durante 1 hora y centrifugando a 5000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se filtró el sobrenadante en papel de filtro de 0.45 µm. En placas petri de 8 cm de diámetro se coloca un disco de papel de filtro, se añade 1 ml del extracto de manera que el papel quede bien empapado y finalmente, se distribuyen al azar 10 semillas de berro. El tratamiento control se realiza con agua destilada. Para cada tratamiento se establecen 5 repeticiones. Las semillas se incuban a 25°C en oscuridad durante 48h, una vez transcurrido el tiempo se detiene la germinación añadiendo 1 ml de etanol a la placa. Posteriormente se cuentan las semillas germinadas por placa y se determina la longitud de la radícula de las mismas. El porcentaje índice de germinación (IG) se determina de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\% \text{ Germinación } n = \frac{\text{Nº de semillas germinadas (extracto)}}{\text{Nº de semillas germinadas (control)}} \times 100$$

$$\text{IG} = \frac{\text{Porcentaje de germinación x longitud radicular (extracto)}}{\text{Porcentaje de germinación x longitud radicular (control)}} \times 100$$

II.1.5. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En el experimento se siguió un diseño de bloques al azar. El efecto de cada uno sustratos orgánicos durante el proceso de vermicompostaje, así como al inicio y final del mismo, se determinó

mediante análisis de la varianza y test de Duncan ($P < 0.05$) utilizando el programa STATGRAPHICS Plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

II.2. RESULTADOS Y DISCUSION

II.2.1. pH Y CONDUCTIVIDAD

El alperujo natural presentó un pH ácido (6,0), característica comun a la mayoría de los residuos orgánicos generados por la agroindustria del olivar. La acidez de ese residuo se debe fundamentalmente a que contiene ácidos orgánicos así como una apreciable cantidad de compuestos polifenólicos (Figura II.3). El alperujo biodegradado por *P. ostreatus* presentó un pH cercano a la neutralidad, debido a la posible oxidación de los compuestos ácidos presente en el alperujo natural (Figura II.1). Olivieri y col (2006) también observan este mismo efecto al bioremediar con *P. ostreatus* el alpechin, residuo líquido producido durante la extracción del aceite de oliva por tres fases, cuyo pH se incremento desde 5 hasta valores comprendidos entre 8 y 9. La conductividad también presentó un leve aumento, 7,2 a 7,6 dS m^{-1} , aunque no significativo durante el proceso de biodegradación del alperujo por *P. ostreatus*.

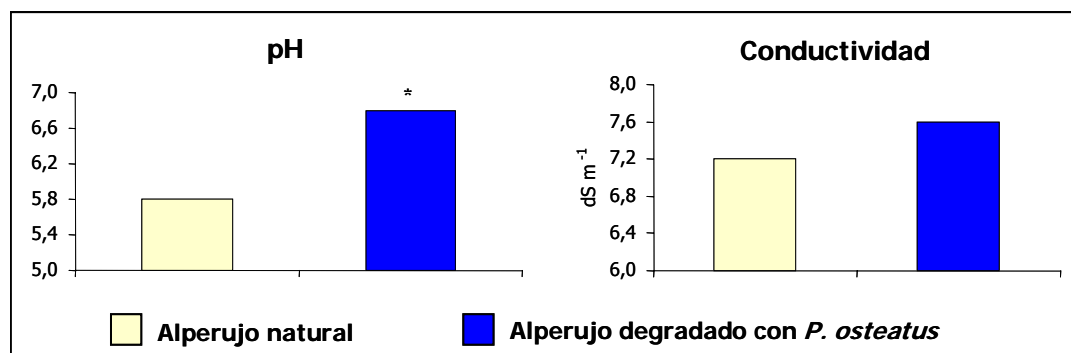


Figura II.1 pH y conductividad en alperujo natural y alperujo biodegradado por *E. foetida*.

Valores medios de tres repeticiones. En cada parámetro, asterico sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y el degradado.

II.2.2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

La bioquímica del suelo posee como actores principales a los microorganismos, quienes por medio de la expresión de sus actividades contribuyen con a su fertilidad y la degradación de sustancias contaminantes presentes en ese medio. La biodegradación es la conversión de sustancias complejas en otras sustancias intermedias más simples o en sus productos finales, catalizadas estos procesos por exoenzimas y endoenzimas. Estas se liberan al suelo, por lisis de las células de hongos y bacterias, y permanecen en el mismo por la protección que les brinda el complejo órgano-mineral (Alef,1995). Por ello, es factible establecer que la determinación de la actividad enzimática en el suelo

o en una enmienda orgánica, constituye un método para evaluar tanto la fertilidad actual como potencial de este recurso natural (Martínez *y col*, 2002; Parinkina, 1994).

La actividad total de la deshidrogenasa en el suelo refleja las reacciones oxidativas globales de la microflora edáfica y, consecuentemente se le considera un buen indicador de la actividad microbiológica (Skujins, 1973). En el alperujo natural la actividad deshidrogenasa era muy baja ($9 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Ello puede atribuirse a una inactivación de los microorganismos debido fundamentalmente a la naturaleza recalcitrante del material de partida, así como a la presencia en el alperujo de ciertos tipos de polifenoles, particularmente tóxicos para los microorganismos (González *y col.*, 1990; Benítez *y col.*, 2005). La biodegradación de este residuo por *P. ostreatus* aumentó significativamente esta actividad, que alcanzó valores de $41 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Figura II.2), lo cual indicaría un aumento apreciable de la actividad microbiana oxido-reductora del sustrato degradado con este basidiomiceto.

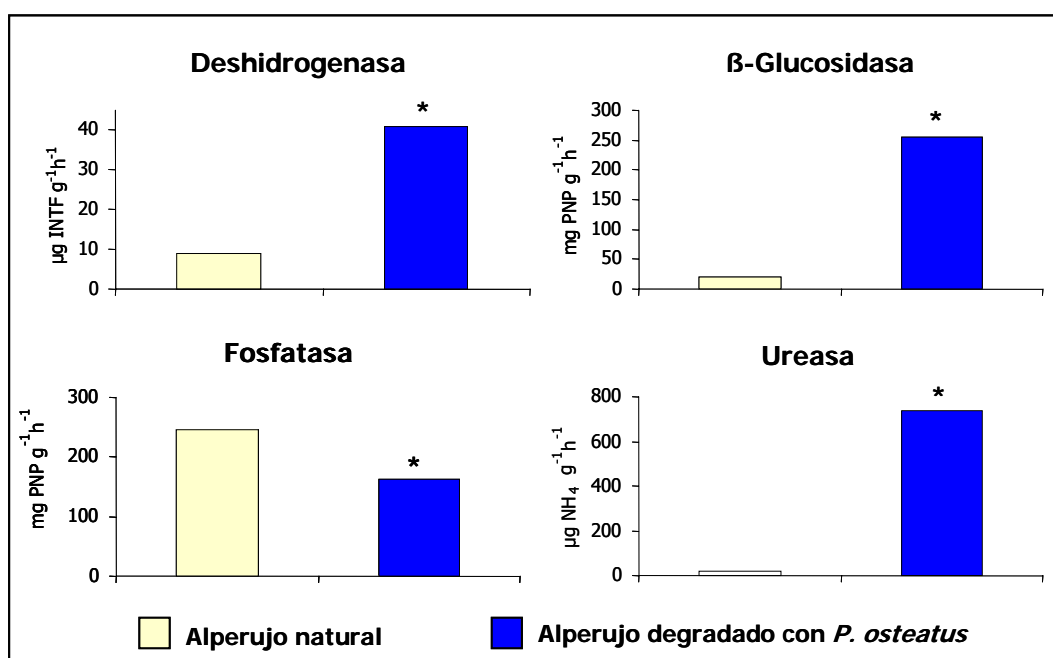


Figura II.2. Actividades deshidrogenasa, β -Glucosidasa, fosfatasa y ureasa en el alperujo natural y alperujo biodegradado por *P. ostreatus*. Valores medios de tres repeticiones. Para cada actividad, asterisco sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y biodegradado

En la biodegradación de la celulosa intervienen diferentes enzimas del sistema enzimático celulolítico, donde se distinguen tres fases: transformación de la celulosa insoluble en celulosa soluble mediante Exoglucanasa, transformación de celulosa soluble en oligosacáridos y celobiosa mediante Endoglucanasa, y transformación de la celobiosa en glucosa mediante (-Glucosidasa. La intervención de la (-Glucosidasa resulta decisiva para que se produzca la degradación completa de la celulosa, puesto que en caso contrario se produciría un aumento de la concentración de celobiosa, que inhibe

precisamente la acción de exocelulasas y endocelulasas. En relación al alperujo natural, la actividad enzimática (-Glucosidasa se vio fuertemente incrementada durante el período de biodegradación, ya que aumento de 19 a 255 mg PNP g⁻¹h⁻¹ (Figura II.2), lo que dejaría patente que *P. ostreatus* desarrolla su estrategia enzimática eficientemente en el plazo de experimentación (6 meses) transformando la celulosa contenida en el alperujo en celobiosa, y más tarde por acción de (-Glucosidasa en glucosa. La producción de (-glucosidasa extracelular y otras enzimas degradadoras de hemicelulosas y celulosas durante el ciclo completo de *P. ostreatus* ha sido señalado en otros estudios donde este hongo creció a sobre residuos lignocelulósicos (Kanan et al. 1999; Morais et al. 2002).

La presencia de microorganismos con gran potencial en la mineralización del fósforo, especialmente en sustratos de baja fertilidad, juega un papel importante en la disponibilidad de este elemento para las plantas. La mineralización del fósforo orgánico está mediada por las enzimas fosfatasa. Muchas veces nos encontraremos con estos sustratos en los que hay presencia de un gran depósito de fósforo orgánico, el cual no puede ser utilizado por las plantas (Curl y Truelove 1986). Estas enzimas pueden ser sintetizadas, tanto por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasa ácida (Ridge y Rovira, 1971; Shaykh y Roberts, 1974; Dinkelaker y Marschener, 1992), como por la flora micótica y las bacterias capaces de producir fosfatasa ácida y alcalina (Dighton, 1983; Tarafdar y Classen, 1988). En suelos con elevados contenidos de fósforo inorgánico las fosfatasa prácticamente no actúan (Silva e Basso, 1993). En el alperujo natural, la actividad fosfatasa fue elevada (245 mg PNP g⁻¹h⁻¹). La biodegradación de este residuo con *P. ostreatus* redujo significativamente esta actividad a 163 mg PNP g⁻¹h⁻¹ (Figura II.2). Esta inhibición se relacionaría por una parte por un consumo de los compuestos organofosforados por el hongo, y por otra, con el aumento de P total del sustrato biodegradado (Tabla II.2), parte del cual se encontraría en forma disponible, el cual inhibiría la síntesis de fosfatasa (Nannipieri y col., 1979; Benítez y col., 2002).

La ureasa cataliza la hidrólisis de urea o de sustratos tipo ureico, dando como productos finales de la reacción CO₂ y NH₃. Bajo esta denominación se agrupan todas las hidrolasas capaces de actuar sobre enlaces C-N (no peptídicos) de aminas lineales. El alperujo natural presenta escasos niveles de nitrógeno y una elevada relación C/N (Tablas II.2, Figura II.4), por lo que la actividad ureasa de ese residuo oleícola fue muy baja (20 µg NH₄⁺g⁻¹h⁻¹) (Tabla III.1). La biodegradación de este residuo por el hongo aumentó muy significativamente los niveles de esta actividad, lo cual se relacionaría con un aumento de los sustratos nitrogenados asimilables presente en el alperujo biodegradado, los cuales pueden sintetizar este enzima (Benítez y col., 1999).

II.2.3.POLIFENOLES Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS

Los polifenoles han sido sugeridos como los principales responsables de la toxicidad de los residuos generados durante la molienda de las aceitunas (Aliotta et al., 2000; Casa et al., 2003). Los efectos alelopáticos observados cuando estos residuos sin biotransformar son usados como enmiendas son también atribuidos a la introducción de algunos compuestos fenólicos en el suelo (Boz et al., 2003). Además la recalcitrancia que poseen esos residuos a su biodegradación se encuentra

estrechamente ligada a los elevados contenidos de polifenoles que presentan (Aggelis et al. 2002; Lessage-Maesen et al. 2001). El alperujo natural utilizado en este estudio presentó una alta concentración de compuestos fenólicos, 43 kg^{-1} , la cual sería responsable de su alta toxicidad y actividad antimicrobiana (Perez et al., 1992; Casa et al., 2003). Sin embargo la inoculación del alperujo con *P.ostreatus* tuvo una alta efectividad en la degradación de polifenoles, alcanzando al final del periodo experimental un valor de $2,6 \text{ g kg}^{-1}$ (Figura II.3), concentración con que se le encuentra normalmente en la superficie de hojas y frutos del olivo.

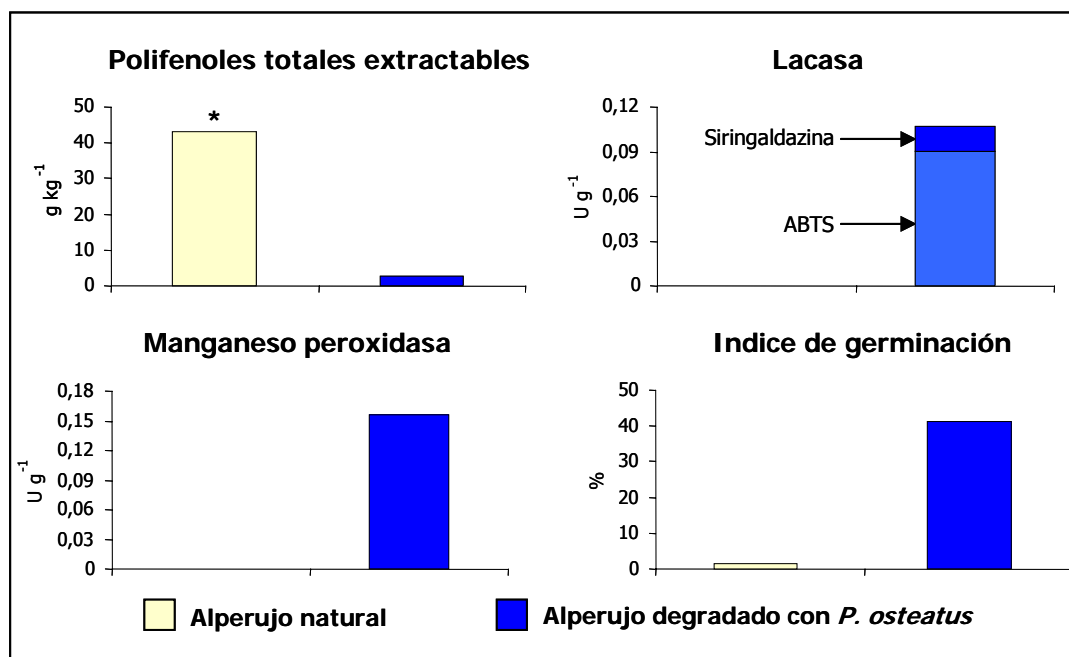


Figura II.3. Polifenoles extractables totales, Lacasa, Mn-peroxidasa e índice de germinación en el alperujo alperujo natural y alperujo biodegradado por *P. ostreatus*. Valores medios de tres repeticiones. Para cada actividad, asterisco sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y biodegradado

Esta eliminación de los compuestos polifenólicos del alperujo debido a la inoculación y desarrollo de *P. ostreatus* es posible por la excreción del exoenzima lacasa en un medio que contiene sustancias fenólicas. Las lacasas son enzimas extracelulares extraordinariamente no específicas que tienen el cobre como cofactor y utilizan oxígeno molecular como un aceptor de electrones y que puede oxidar polifenoles como también otros compuestos (Robles et al. 2000; Davis & Burns, 1990). En nuestro estudio la actividad lacasa medida usando siringaldazina como sustrato cromogénico o por oxidación de ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (Figura II.3) fue registrada en el alperujo degradado por *P. ostreatus*, como también había sido observada en otros estudios en los que se había ensayado sustratos orgánicos con elevados contenidos de compuestos fenólicos (Linares et al. 2003; Tomati et al. 1991).

Aunque las lacasas excretadas por los hongos están muchas veces asociadas con la esporulación, formaciones rizomorfas, y cuerpos fructíferos (Tour et al. 1995), la actividad enzimática observada en

nuestro estudio implica que esta enzima puede ser también producida durante el desarrollo metabólico primario de *Pleurotus ostreatus*. Este hecho sugiere, como indican Tomati y col. (1991) y Tsioulpas et al. (2002) que *P. ostreatus* saca provecho de la reacción de la lacasa, lo cual involucra un procedimiento de detoxificación, preparando el sustrato para el crecimiento microbiano. En este mismo estudio también fue detectada la enzima manganeso-peroxidasa (MnP) (Figura II.3), una enzima lignocelulósica que oxida componentes fenólicos de la lignina, mediante la reacción de oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , que es dependiente del H_2O_2 , (Wesenberg *et al.*, 2003). La producción de este enzima por *P. ostreatus* no es frecuente, y en general, únicamente han sido detectadas lacasas cuando este hongo de la podredumbre blanca crece en sustratos orgánicos con elevados contenidos en compuestos fenólicos (Aggelis y col, 2002, 2003).

La drástica reducción en los compuestos fenólicos, conjuntamente con el aumento de la concentración de la mayoría de los nutrientes en el alperujo biodegradado con *P. ostreatus* se tradujo en un acusado aumento del índice de germinación (41%) de las semillas de berro ensayadas (Figura II.3), y por tanto una significativa disminución de su fototoxicidad. Sin embargo, no se alcanzó el valor del 60 % establecido por Zucconi y col., 1981 para considerar a una enmienda orgánica como carente de fitotoxicidad. La existencia de una cierta fitotoxicidad se encontraría relacionada con la posible presencia en el alperujo degradado con *P. ostreatus* de productos de la oxidación de la reacción de la lacasa (quinonas, radicales fenoxi), los cuales no habrían precipitado y serían más tóxicos que los compuestos fenólicos originales (Martirani y col.1996, Tsioulpas y col., 2002).

II.2.4. FRACCIONES ORGÁNICAS Y NUTRIENTES

La biodegradación con *P. ostreatus* disminuyó significativamente el contenido del carbono orgánico total contenido en el alperujo natural (Figura II.4). Porcentualmente, esa disminución fue de un 21%, debida a la mineralización de la materia orgánica del residuo durante su biodegradación. Singh y Sharma (2002) observan pérdidas de carbono orgánico similares durante la descomposición de residuos de paja de trigo inoculados con *Pleurotus sajor-coju* solos o en combinación con otros hongos.

El carbono orgánico del alperujo contiene apreciables cantidades de carbono hidrosoluble (147 g kg^{-1}). Este carbono contiene la fracción más fácilmente metabolizable de la materia orgánica (Ceccanti et al. 1997; García et al. 1994), y en ella se incluyen varios tipos de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como polifenoles, ácidos alifáticos simples, ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares (Fox & Cormfield, 1990). El consumo de estas fracciones orgánicas durante el desarrollo del hongo en el alperujo redujo significativamente (49%) los niveles de carbono hidrosoluble al final del periodo experimental (Figura II.4).

Tanto el carbono orgánico extraído con pirofosfato (CET) como los contenidos de ácidos húmicos experimentaron una significativa disminución por la inoculación del alperujo con *P. ostreatus* (Figura II.4). Porcentualmente esas disminuciones fueron, respectivamente de un 30 y 42%. La solución de pirofosfato utilizada para extraer las sustancias húmicas también puede extraer otros componentes

orgánicos, como los compuestos más fácilmente metabolizables (Boyd y col. 1980, Ciavatta y col. 1993), los cuales están presentes en grandes cantidades en el alperujo natural. La desaparición de estos compuestos orgánicos durante la biodegradación de alperujo con *P.ostreatus* explicaría la disminución del CET y AH registrados en el producto final.

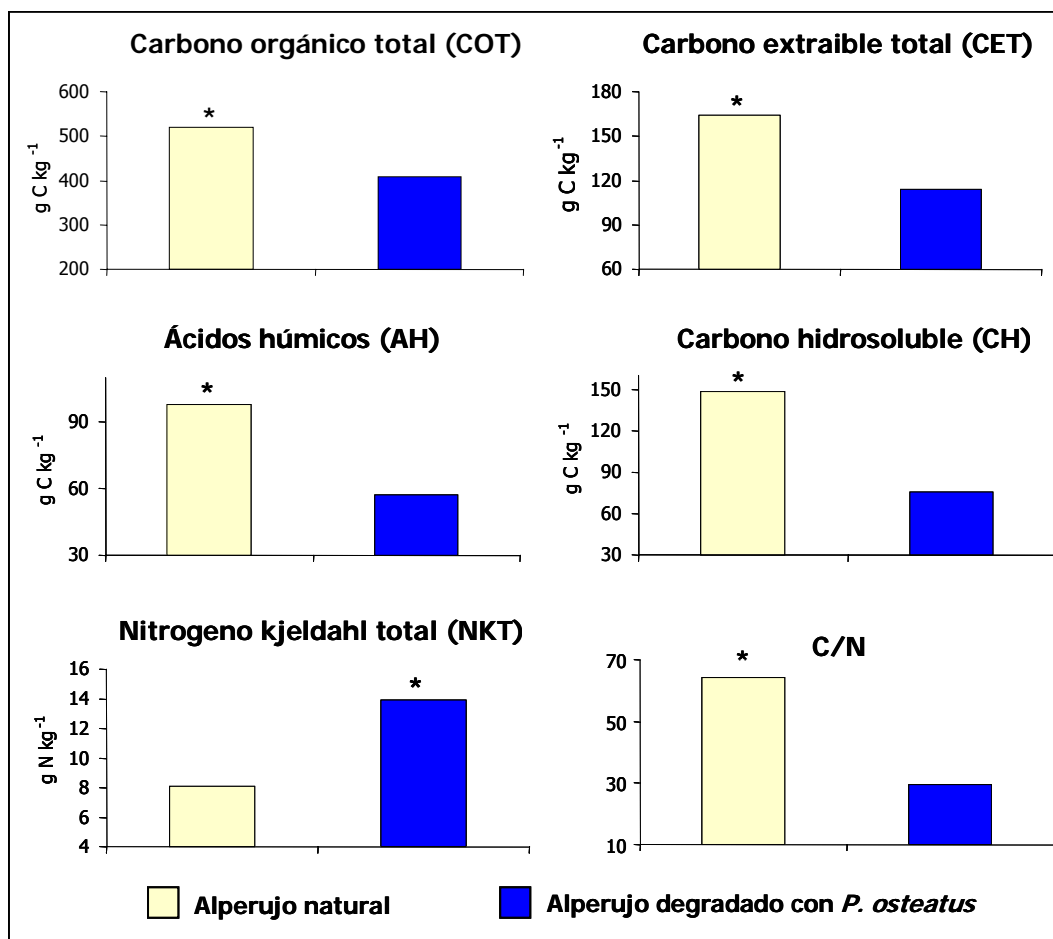


Figura II.4. Fracciones orgánicas, nitrógeno y relación C/N en alperujo natural y alperujo biodegradado por *P. ostreatus*. Valores medios de tres repeticiones. Para cada parámetro, asterisco sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y biodegradado

La concentración de nitrógeno total Kjeldahl (NKT) se incrementó después de la biodegradación de alperujo con *P.ostreatus* (Figura II.4). Este incremento podría deberse a un efecto de concentración debido a la mineralización de la materia orgánica producida durante la biodegradación. Además, y aunque no hay información disponible de cómo *P.ostreatus* afecta a la concentración de nitrógeno en sustratos orgánicos lignocelulósicos, algunas especies de hongos basidiomicetos como *P.sajor-caju* tienen capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Ginterova & Maxianova, 1975; Rangaswami et al. 1975), aumentando con ello la concentración de este nutriente en los sustratos

Como resultado del aumento de la concentración de nitrógeno total y la reducción del carbono orgánico total, la relación C/N disminuyó apreciablemente (Figura II.4). Pese a esa reducción, el

producto obtenido de la biodegradación del alperujo con *P. ostreatus* presentó una relación C/N ligeramente elevada (29), lo que le confiere al mismo un escaso grado de estabilidad y una moderada potencialidad para que todavía pueda ser biodegradado si es utilizado como sustrato en procesos específicos.

Tabla II.1. Concentración de macronutrientes y micronutrientes en el alperujo natural y alperujo biodegradado con *P. ostreatus* (AP). Valores medios de tres repeticiones

P g kg ⁻¹		K g kg ⁻¹		Ca g kg ⁻¹		Mg g kg ⁻¹	
A	AP	A	AP	A	AP	A	AP
0,8	11*	11	21*	4,5	27*	1,2	4,2*
Fe mg kg ⁻¹		Mn mg kg ⁻¹		Cu mg kg ⁻¹		Zn mg kg ⁻¹	
A	AP	A	AP	A	AP	A	AP
419	1820*	12	43*	9	22*	10	33

* Indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre A y AP para cada elemento

La concentración de los otros nutrientes (P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu and Zn) aumentó significativamente después de la biodegradación del alperujo con *P. ostreatus*, probablemente debido a un efecto de concentración de esos elementos en el sustrato por la mineralización de la materia orgánica (Tabla II.1). Particularmente, ese aumento fue muy acusado para el fósforo, lo cual sería debido, además del efecto de concentración reseñado, al uso durante la inoculación del hongo en el alperujo de una solución tampón de fosfato pH 6 (apartado II.1.3), la cual habría aumentado la concentración de este elemento en el sustrato inicial.

III. BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO NATURAL UTILIZANDO LOMBRICES DE LA ESPECIE *EISENIA FOETIDA*



III.1. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.1. MATERIALES

- Alperujo u orujo procedente de la extracción del aceite de oliva mediante proceso de centrifugación por dos fases suministrado por la empresa ROMEROLIVA, Deifontes, Granada. Este alperujo fue el mismo utilizado en el capítulo II de la presente memoria de Tesis Doctoral
- Lombrices cliteladas y no cliteladas de la especie *Eisenia foetida* (Bouché, 1972) procedentes del stock mantenido en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

III.1.2. PREPARACIÓN DE LOS RECIPIENTES

Un kilogramo de alperujo natural fue colocado, por triplicado, en recipientes de PVC, de 2 l de capacidad (Figura III.1). En cada recipiente se colocó una fina esponja circular en el fondo para facilitar su drenaje, depositándose sobre ella el alperujo natural. Debido a la posible naturaleza agresiva de este residuo sobre las lombrices, se colocó sobre ese material una capa de aclimatación constituida por estiércol maduro. El objetivo fue que las lombrices inoculadas se vieran forzadas a entrar en el sustrato una vez agotados los nutrientes de la capa de aclimatación, permitiendo a su vez su acercamiento gradual al sustrato ensayado. Además, ésta capa sirve como fuente de inóculo de microorganismos que iniciarán la degradación del material orgánico (Benítez *y col.*, 1999).



Figura III.1. Recipiente utilizado para el desarrollo del proceso de biodegradación del alperujo natural con lombrices

III.1.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el proceso de biodegradación del alperujo, en la capa de aclimatación de cada recipiente se introdujo una biomasa de lombriz total equivalente al 10% del peso seco del sustrato orgánico ensayado. La especie utilizada, *Eisenia foetida*, fue separada del stock manualmente, estando sus pesos comprendidos entre 0.1-0.60 g comprendiendo individuos clitelados y no clitelados. Una vez inoculadas las lombrices, el material orgánico se llevó a una humedad comprendida entre el 80-85%. Posteriormente los recipientes fueron tapados con una tela fina que permite el intercambio gaseoso con el exterior y la posible huida de las lombrices. Todo el proceso se lleva a cabo en una cámara de vermicompostaje en condiciones de oscuridad y temperatura controlada (25°C). La humedad de los sustratos se mantuvo constante mediante riegos periódicos con un pulverizador de agua.

Mensualmente, y durante un periodo de 6 meses, se realizaron muestreos para la determinación de la biomasa total de las lombrices. Para ello, el sustrato ensayado de cada recipiente fue volcado en una bandeja y las lombrices separadas manualmente del mismo. El procedimiento de pesada de lombrices fue similar al utilizado por otros autores (Lofs-Holmin, 1980; Elvira, 1993) y consiste en separar manualmente las lombrices, lavarlas rápidamente en agua e introducirlas en un recipiente ligeramente húmedo; justo antes de la pesada cada lombriz es colocada unos segundos sobre papel de filtro que absorbe rápidamente el agua de lavado. Una vez pesadas, las lombrices y el sustrato fueron depositados de nuevo en los potes. Mensualmente, de cada recipiente se tomó una muestra de sustrato orgánico que fue almacenada en botes de plástico y conservada a 4 °C para su posterior análisis.

A los 6 meses del inicio del experimento, y tras pesarlas y clasificarlas, las lombrices fueron devueltas al stock del que inicialmente se recogieron. El producto final (Alperujo biodegradado por *Eisenia foetida* o vermicompost de alperujo natural) fue retirado. Una parte de este sustrato fue secado al aire y guardado en bolsa para su análisis químico y fitotóxico. La otra parte del sustrato fue guardada en bolsas a 4°C para su posterior análisis enzimático. Esos mismos análisis fueron realizados para el alperujo natural

III.1.4 ANÁLISIS EFECTUADOS MENSUALMENTE DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO POR *E. foetida*.

Mensualmente, y durante un periodo de seis meses, se efectuaron los siguientes análisis en el material orgánico contenido en cada recipiente:

- Carbono Hidrosoluble, según método II.1.4.4.
- Polifenoles Totales Extractables, según método II.1.4.6
- Actividad Deshidrogenasa, según método II.1.4.7.1.

- Actividad β -Glucosidasa, según método II.1.4.7.2.
- Actividad Fosfatasa, según método II.1.4.7.3.
- Actividad Ureasa, según método II.1.4.7.4.

III.1.5. ANÁLISIS DE LOS SUSTRATOS INICIALES Y PRODUCTOS FINALES DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO POR *Eisenia foetida*.

En el alperujo natural y producto final obtenido después de seis meses de biodegradación por *E. foetida* se efectuaron los siguientes análisis:

- pH, según método II.1.4.1.
- Conductividad Eléctrica, según método II.1.4.2.
- Carbono Orgánico Total, según método II.1.4.3.
- Carbono extraíble total, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, según método II.1.4.5.
- Nitrógeno kjeldahl total, según método II.1.4.8.1.
- Análisis de otros elementos, según método II.1.4.8.2
- Mineralización Nítrico-Perclórica de las muestras, según método II.1.4.8.2.1.
- Fósforo Total del Mineralizado, según método II.1.4.8.2.2.
- Potasio Total del Mineralizado, según método II.1.4.8.2.3.
- Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, según método II.1.4.8.2.4.
- Análisis de la fitotoxicidad, según método II.1.4.9.

III.1.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En el experimento se siguió un diseño de bloques al azar. El efecto de cada uno de los sustratos orgánicos durante el proceso de vermicompostaje, así como al inicio y final del mismo, se determinó mediante análisis de la varianza y test de Duncan ($P < 0.05$) utilizando el programa STATGRAPHICS Plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

III. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. 2.1. EVOLUCION DE LA BIOMASA TOTAL Y NUMERO DE LOMBRICES DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO POR *E. foetida*.

Con objeto de monitorear la población de lombrices presentes durante la biodegradación del alperujo natural se ha considerado determinar la evolución de la biomasa total de esos anélidos y la evolución del número total de individuos distinguiendo a su vez dos estamentos de lombrices: juveniles no maduros sexualmente o no clitelados y maduras sexualmente o cliteladas.

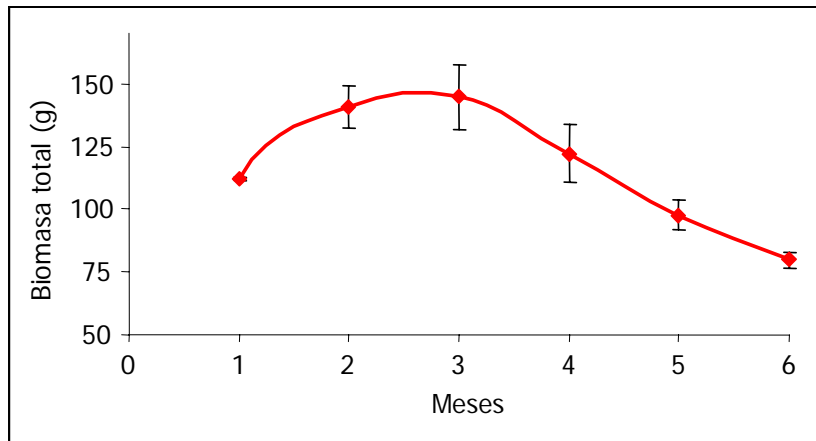


Figura III.2. Evolución de la biomasa de lombrices durante el proceso de biodegradación del alperujo natural. Valores medios de tres repeticiones

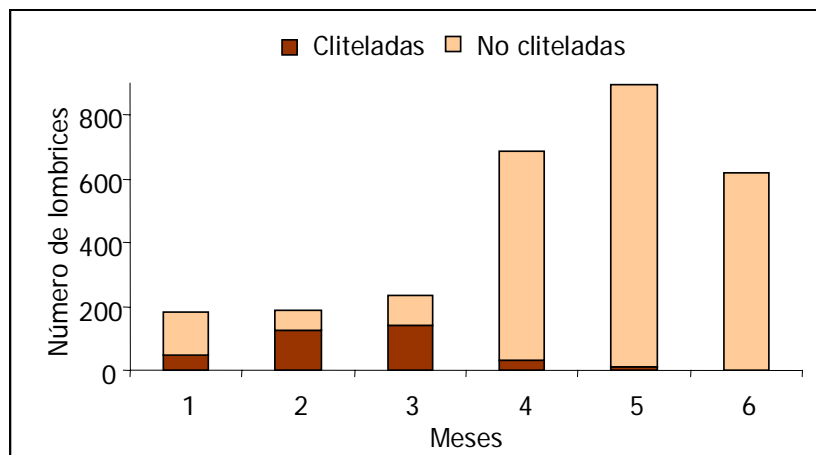


Figura. III.3. Evolución del número total de lombrices cliteladas y no cliteladas durante el proceso de biodegradación del alperujo natural. Valores medios de tres repeticiones

Todas las lombrices inoculadas se habían introducido en el alperujo natural al mes de su inoculación en la capa de aclimatación. Al mes, la biomasa total de las lombrices fue de 112 g, valor ligeramente superior a la inicialmente inoculada (Figura III.2). En este periodo, el número total de lombrices fue de 182, correspondiendo el 22% a individuos clitelados y el 78% a no clitelados (Figura III.3). La biomasa y número total de lombrices aumentó consistentemente hasta el tercer mes (145 g, 235 lombrices), con un aumento porcentual del número de individuos clitelados (60%). A partir del tercer mes, la biomasa total de las lombrices disminuyó acusadamente hasta el final del periodo de biodegradación (Figura III.2). Sin embargo el número de lombrices siguió aumentando alcanzando su máximo al quinto mes, aunque tanto en este mes como en el siguiente todas las lombrices no tuvieron clitelo (Figura III.3). La pérdida de biomasa y la existencia exclusiva de lombrices no cliteladas y de pequeño tamaño (0-05-0,15 mg) al final

del periodo experimental implicaría que los recursos nutricionales contenidos en el alperujo habrían sido ya, mayoritariamente, consumidos, encontrándose este residuo ya biodegradado, siendo necesario por ello, una nueva aplicación de alperujo natural a los recipientes si el objetivo finalista del experimento hubiera sido aumentar la población de anélidos (Neuhauser y col., 1988; Nogales y col., 1999a,b).

III.2.2. EVOLUCIÓN DEL CARBONO HIDROSOLUBLE DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO POR *E. foetida*.

El carbono hidrosoluble durante la biodegradación del alperujo por acción de *E.foetida* y microorganismos disminuyó a lo largo del tiempo de experimentación (Figura III.4). Este descenso fue particularmente acusado durante el primer mes del proceso (de 148 g kg^{-1} a 21 g kg^{-1}). Los descenso observados serían debidos a que este tipo de carbono contiene la fracción de la materia orgánica fácilmente metabolizable (Ceccanti y col., 1997; García y col., 1994), y por tanto es la fracción que se degrada más rápidamente por la acción de los microorganismos y las lombrices (Benítez y col., 1999). Además de ello, una pequeña porción del carbono desaparece probablemente con los lixiviados generados con el riego. Durante los últimos meses del proceso se produce una estabilización en los niveles de carbono hidrosoluble, hecho que concuerda con otros estudios realizados con materiales orgánicos de naturaleza similar (Benitez y col., 2002) y que muestra que la mayoría de los substratos orgánicos fácilmente metabolizables contenidos en el alperujo habrían sido ya consumidos por los microorganismos y las lombrices (Benítez y col., 1999).

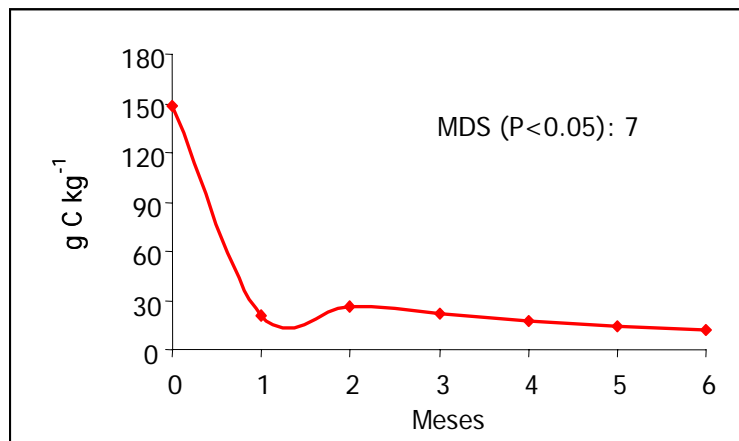


Figura III.4. Evolución del carbono hidrosoluble durante el proceso de biodegradación del alperujo natural. Valores medios de tres repeticiones.

III.2.3. EVOLUCIÓN DE LOS POLIFENOLES TOTALES EXTRAIBLES DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO POR *E. foetida*.

La acción conjunta de lombrices epígeas y microorganismos se mostró muy eficaz para reducir significativamente los elevados contenidos de polifenoles totales extraíbles contenidos en el alperujo

natural (Figura III.5). Ello tuvo lugar de forma muy acusada durante el primer mes de biodegradación donde los niveles de polifenoles totales extraíbles del alperujo se redujeron en un 81 %. Posteriormente los niveles de polifenoles siguieron reduciéndose hasta el tercer mes, manteniendo valores de 1,5 g ac-faéico kg⁻¹ sustrato hasta el final del periodo experimental.

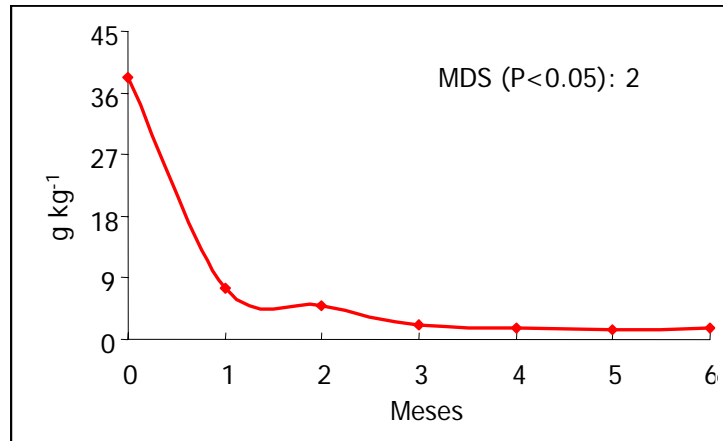


Figura III.5. Evolución de los polifenoles totales extraíbles durante el proceso de biodegradación del alperujo natural. Valores medios de tres repeticiones

La drástica reducción del contenido de polifenoles, cuya evolución se correlaciona ($P < 0,001$) con la del carbono hidrosoluble (figura III.4), podría ser debida a la elevada actividad microbiana registrada en el sustrato ensayado, que junto con el mantenimiento de las condiciones aerobias durante su biodegradación favorecería la oxidación de estos compuestos tóxicos. Además la posible activación de microorganismos específicos o la liberación por las lombrices de una flora microbiana específica con capacidad para sintetizar enzimas con potencialidad para degradar esos compuestos podría explicar la reducción de polifenoles observadas, aunque ello debe ser confirmado con estudios específicos que avalen o refuten este mecanismo de biodegradación de polifenoles. Por último, no hay que descartar que una fracción de los polifenoles contenidos en el alperujo pudieran lixivarse, como ocurre con otros elementos (Nogales y col., 1999a) en las aguas que percolaron durante el proceso de biodegradación.

III.2.4. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO POR *E. foetida*.

Las oxidoreductasas e hidrolasas son enzimas que actúan en los procesos básicos de la descomposición de la materia orgánica, y pueden ser usadas como biomarcadores de las reacciones involucradas en los ciclos del carbono, nitrógeno y fósforo (Dick y Tabatabai, 1993; Nannipieri, 1994).

La oxidación de los compuestos orgánicos se realiza generalmente mediante procesos de deshidrogenación que son llevados a cabo mediante enzimas denominadas deshidrogenasas, las cuales han sido utilizadas para evaluar la actividad metabólica de los microorganismos (Pascual, 1996; Trevors, 1984). Las deshidrogenasas están correlacionadas positivamente con la biomasa microbiana, con el

contenido en materia orgánica y con la respiración basal (García y Hernández, 1997). El análisis de la actividad deshidrogenasa supone la utilización de un método simple, el cual está relacionado con la actividad microbiana asociada con la transformación inicial de la materia orgánica (Bolton *y col.*, 1985). Asimismo, Beyer *y col.* (1993) puntualizan que la interpretación de la actividad deshidrogenasa debe ir acompañada de un estudio simultáneo de otras propiedades microbianas (biomasa microbiana, actividades enzimáticas hidrolíticas, etc.).

Tabla III.1. Cambios en las actividades enzimáticas durante el proceso de biodegradación del alperujo por *E. foetida*. Valores medios de tres repeticiones. Los valores en actividad enzimática seguidos con la misma letra no son significativos $P < 0.05$. ($P < 0.05$)

meses		0	1	2	3	4	5	6
Deshidrogenasa	$\mu\text{gINTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$	9f	530b	733a	480b	390c	312d	248e
β -Glucosidasa	$\text{mgPNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$	19c	21c	94b	112b	144a	135a	113b
Fosfatasa	$\text{mgPNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$	245a	159b	180b	70c	78c	89c	95c
Ureasa	$\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$	20f	100e	539a	422bc	365d	463b	393cd

La actividad deshidrogenasa registrada en el alperujo, como se indicó en el capítulo anterior, fue prácticamente nula ($9,0 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Sin embargo, al cabo de un mes, se produjo un aumento significativo de la actividad deshidrogenasa (Tabla III.1, Figura III. 6), alcanzando como valor máximo de la actividad $733,7 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$ al segundo mes. Este aumento está probablemente relacionado con la actividad hidrolítica que realizan las lombrices sobre el alperujo, el cual es susceptible de ser atacado por los microorganismos (Hartenstein y Hartenstein, 1981). Además de esto, el paso del material a través del intestino de las lombrices produce una activación tanto de la actividad deshidrogenasa como de la biomasa microbiana (Parle, 1963a,b). Finalizado el segundo mes, y hasta el final del proceso de biodegradación, la actividad deshidrogenasa disminuyó paulatinamente, descenso relacionado con la disminución del crecimiento microbiano (García *y col.*, 1994; Benítez *y col.*, 1999) debida al agotamiento de las fuentes de carbono disponible.

La β -glucosidasa es una hidrolasa relacionada directamente con el ciclo del carbono y que actúa sobre los enlaces β -glucósidos de las grandes cadenas de carbohidratos. La evolución de la actividad β -glucosidasa durante el proceso de biodegradación del alperujo (Tabla III.1) siguió una tendencia similar a la observada para la actividad deshidrogenasa, ajustándose la curva a una ecuación de segundo grado (Figura III.6). Esta actividad tiende a aumentar significativamente desde el primer mes de biodegradación alcanzando su máximo en el cuarto mes ($144,3 \text{ mg PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$). A partir de este mes disminuye, siendo este descenso significativo al final del periodo experimental. La evolución de esta actividad dejaría patente la lenta liberación de glucósidos presentes en el alperujo que producen la síntesis de esta enzima (Burns, 1982) y, además, indicaría que al final del proceso todavía existe material susceptible de ser degradado. El alperujo es un material rico en carbono pero de difícil degradación dada su naturaleza

recalcitrante. La acción de las lombrices es fundamental en la liberación al medio de sustratos fácilmente asimilables por los microorganismos, los cuales inducirían la síntesis de β -glucosidasa. Además, la acción de las lombrices aumentaría las poblaciones de hongos y actinomicetos en el alperujo, lo cual favorecería, como ha sido observado en otros estudios, el aumento de la actividad β -glucosidasa (Hayes, 1986; Tliquia y col., 2001).

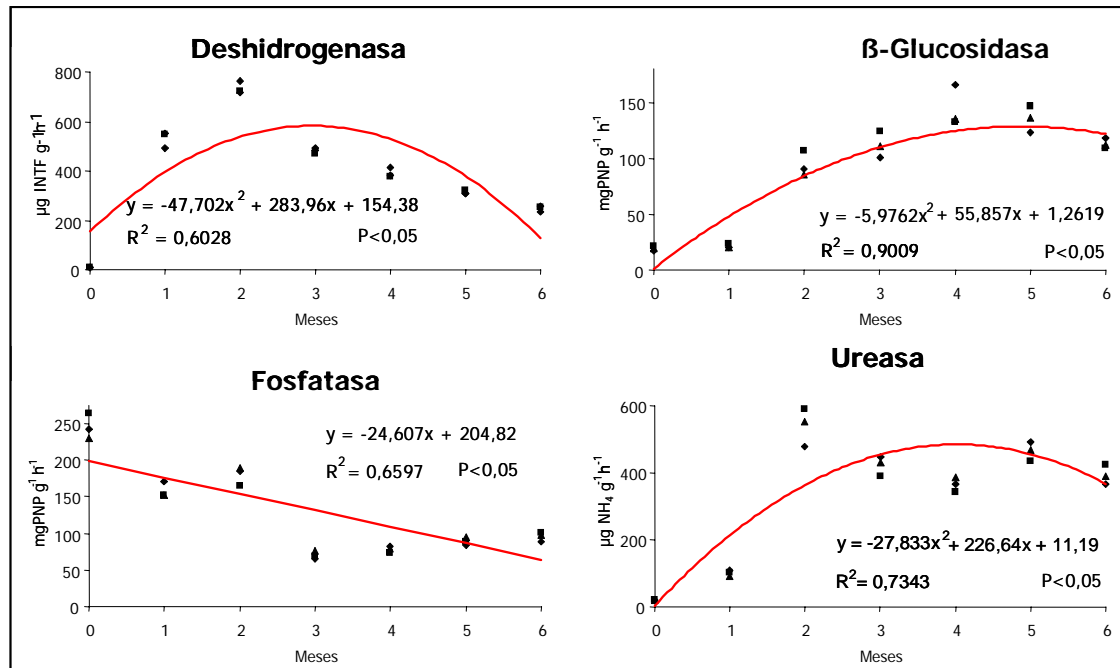


Figura III.6. Evolución de las actividades enzimáticas durante el proceso de biodegradación del alperujo por *E. foetida*.

La fosfatasa es una hidrolasa que actúa en la hidrólisis de ésteres fosfóricos, liberando fosfato inorgánico que puede ser asimilado por los microorganismos y las plantas. La biodegradación del alperujo produjo un descenso de esta actividad, especialmente acusado durante los tres primeros meses (Tabla III.1). A partir de este mes y hasta el final del proceso la actividad la actividad fosfatasa tendió a estabilizarse, aunque globalmente la evolución de esa actividad se ajustó a una curva de regresión lineal negativa durante todo el proceso de biodegradación (Figura III.6). El descenso observado de esta actividad durante los primeros meses se relacionaría con una disminución de compuestos orgánicos fosforados que favorecen la síntesis de este enzima, así como por un aumento de los niveles de fosforo inorgánico en el sustrato que inhiben la síntesis de fosfatasa (Nannipieri y col., 1979; Benitez y col., 2002).

Como se indicó en el apartado II.2, el alperujo es un residuo oleícola que presenta una escasa actividad ureasa. Sin embargo, y a partir del primer mes de vermicompostaje, la actividad aumentó significativamente hasta alcanzar un máximo de $539 \mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ al segundo mes, disminuyendo y estabilizándose en valores de $393\text{-}463 \mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ al final del periodo experimental. Por ello, la evolución de esa actividad al igual que la β -glucosidasa se ajustó a una curva de segundo grado (Figura III.6), y los elevados valores aun registrados al final del proceso biodegradativo implicaría que todavía

quedan en el alperujo biodegradado sustratos nitrogenados asimilables por los microorganismos que podrían sintetizar esa enzima.

III.2.5. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEL ALPERUJO AL INICIO Y AL FINAL DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN POR *E. foetida*.

III.2.5.1. pH Y CONDUCTIVIDAD

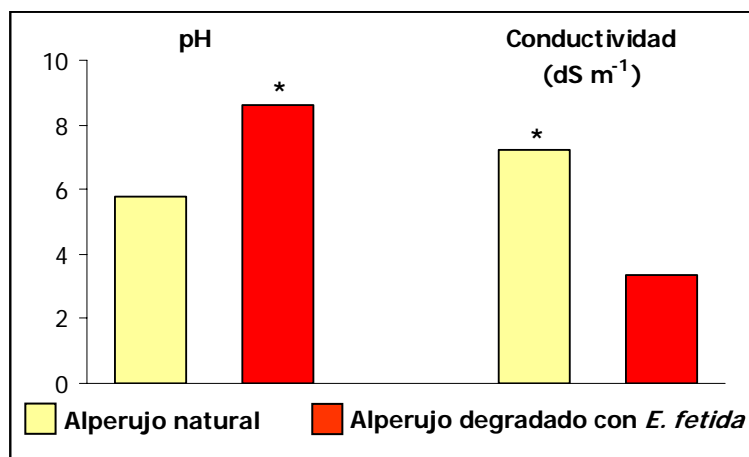


Figura III.7. pH y conductividad en alperujo natural y alperujo biodegradado por *E. foetida*. Valores medios de tres repeticiones. En cada parámetro, asterisco sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y el biodegradado.

La biodegradación con *E. foetida* aumentó significativamente el pH ácido del alperujo, que alcanzó valores ligeramente alcalinos. El proceso de vermicompostaje a escala laboratorio tiende a aumentar el pH de este subproducto hasta valores máximos de 8.6 (Figura III.7). Este aumento sería atribuible a la desaparición de los elevados contenidos de ácidos volátiles presentes en alperujo (Giannoutsou *y col.*, 1997), debido a las condiciones aerobias mantenidas durante su degradación por *E. foetida*.

La conductividad inicial del alperujo natural disminuyó en el producto final obtenido después de su biodegradación por *E. foetida*. Descensos similares se observan también en otros procesos de vermicompostaje con residuos de características similares (Elvira *y col.*, 1998; Benitez *y col.*, 2002), y son debidos al lavado de las sales presentes en el alperujo por las aguas que percolaron de los recipientes. Esta reducción supone una mejora de la calidad agrícola de los vermicomposts a base de alperujos u orujos de 2 fases, los cuales podrían ser utilizados sin problemas de salinidad en agricultura (Bunt, 1988).

III.2.5.2. CARBONO ORGÁNICO TOTAL, CARBONO EXTRAIBLE TOTAL Y SUSTANCIAS HÚMICAS

La biodegradación inducida por la presencia de lombrices epígeas disminuyó significativamente los valores del carbono orgánico total del alperujo natural (figura III.8). Estos resultados concuerdan con otros resultados en los que también se utilizan diferentes residuos orgánicos de procedencia agroindustrial (Elvira *y col.*, 1998; Nogaqles *y col.*, 1999; 2005). El alperujo, a pesar de ser un residuo recalcitrante a la degradación por su alto contenido en polifenoles y lignina y presentar una relación C/N muy elevada (64.3) y desfavorable para el desarrollo de los microorganismos (Romero *y col.*, 2003) sufre un acusado proceso de mineralización (33 %). Ello sería debido a la acción de las lombrices y en su acción detritívora que ejercen sobre el sustrato (acción directa), así como la secreción de enzimas hidrolíticos en el tubo digestivo y el aumento de la relación superficie/volumen que producen sobre el material orgánico (acción indirecta), provocan una variación en la cantidad y el tipo de población de microorganismos que acelerarían el proceso de mineralización de la materia orgánica.

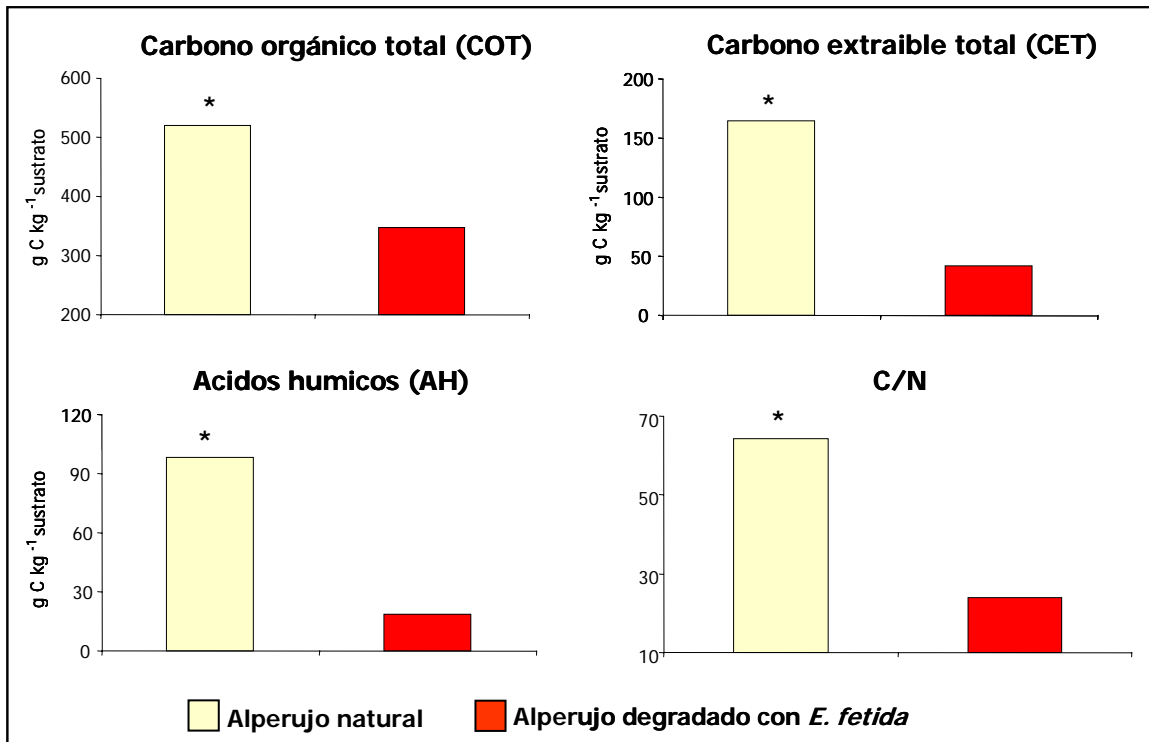


Figura III.8. Fracciones orgánicas y relación C/N en alperujo natural y alperujo biodegradado por *E. foetida*. Valores medios de tres repeticiones. Para cada parámetro, asterisco sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y biodegradado

Los niveles de carbono total extraíble y los de ácidos húmicos en el alperujo biodegradado con *E. foetida*, fueron, al igual que lo observado en el alperujo biodegradado con *P. ostreatus*, significativamente menores que en el alperujo natural (Figura III.8). En los procesos de bioestabilización de los residuos orgánicos materia orgánica, entre otros compostaje o vermicompostaje, la humificación debe predominar sobre la mineralización de la materia orgánica, y el carbono extraíble con pirofosfato y los ácidos húmicos de los materiales orgánicos deberían aumentar al final de esos procesos (Albanell *y col.*, 1988; Elvira *y*

col., 1998). Sin embargo, algunos residuos orgánicos presentan elevadas concentraciones de compuestos fácilmente degradables, tales como azúcares, aminoácidos, lípidos, péptidos, polifenoles etc., los cuales pueden extraerse junto con las sustancias húmicas y ser cuantificadas como tales (Ciavatta y *col.*, 1993; Benítez y *col.*, 2000a, 2002). Dichos compuestos que formarían parte de la fracción orgánica hidrosoluble, son fácilmente degradados por los microorganismos, por lo que tienden a desaparecer en esos procesos, reduciendo globalmente el contenido de CET y AH al final de ellos.

La disminución del contenido total de carbono orgánico y el aumento de la concentración del nitrógeno kjeldahl total (Tabla III.2) en el alperujo biodegradado conlleva una significativa reducción de la relación C/N de ese producto final respecto al alperujo natural (Figura III.8). La relación C/N (24) del alperujo biodegradado por *E. foetida*, fue menor que la registrada en el alperujo biodegradado por *P. ostreatus*, y le conferiría a éste producto un moderado grado de estabilidad y un valor añadido agronómico. Por tal motivo, su aplicación al suelo como enmienda orgánica, debe favorecer la activación de la flora microbiana existente en ese medio, cuyo óptimo de desarrollo se encuentra en microhábitats de relación C/N de alrededor de 30.

III.2.5.3. MACRONUTRIENTES Y SODIO

Las concentraciones de macronutrientes, excepto potasio, aumentaron, por la biodegradación del alperujo por *E. foetida* (Tabla III.2).

Tabla III.2. Concentración de macronutrientes y sodio en el alperujo natural (A) y alperujo biodegradado por *E. foetida* (AE). Valores medios de tres repeticiones

N g kg ⁻¹		P g kg ⁻¹		K g kg ⁻¹		Ca g kg ⁻¹		Mg g kg ⁻¹		Na mg kg ⁻¹	
A	AE	A	AE	A	AE	A	AE	A	AE	A	AE
8,1	14,6*	0,8	2,2*	11*	8,9	4,5	21,5*	1,2	5,6*	750	417

* Indica una diferencia significativa (P<0.05) entre A y AE para cada elemento

El mayor contenido de nitrógeno en el alperujo biodegradado por *E. foetida* se encontraría con un efecto de concentración de este elemento debido a la mineralización de la materia orgánica contenida en el alperujo (Elvira y *col.*, 1998). Además algunos autores indican que además la liberación de productos nitrogenados del metabolismo de las lombrices podría aumentar la cantidad de nitrógeno del sustrato (Edwards y Lofty, 1972). Según Lee, 1985 la incorporación de nitrógeno residual en el sustrato se podría llevar a cabo a través de cuatro vías: i) deposición de heces; ii) excreción de orina, formada básicamente por amonio y urea; iii) secreción de proteínas a través del mucus excretado por células glandulares de la epidermis; iv) por la descomposición de los tejidos de las lombrices muertas, cuyo contenido en N es aproximadamente del 12%. Además de esta posible incorporación, Simek y *col.*, (1991) observaron que las lombrices favorecían la fijación de N y encontraron un aumento de la actividad nitrogenasa propia de

las bacterias nitrificantes. Otros estudios demuestran que el contenido de N aumenta por la absorción de amonio del aire o debido a una fijación del mismo por parte de bacterias bajo condiciones de bajo N disponible (Engelstad, 1991).

En la tabla III.3 se observa asimismo un aumento significativo de la concentración de fósforo total en el alperujo biodegradado. Este aumento, que aparece en otros estudios en los que se utilizan residuos orgánicos (Elvira y col., 1998; Satchell y Martin, 1984.), se debe fundamentalmente a un proceso de concentración del P inorgánico, motivada por la mineralización de parte de la materia orgánica, e indica que este macronutriente no es eliminado por lavado. El aumento de P inorgánico explicaría la disminución de la actividad fosfatasa (Tabla III.1, Figura III.6) experimentada durante el proceso de biodegradación del alperujo por *E. foetida*.

El resto de los macronutrientes analizados, calcio y magnesio presentaron también concentraciones mayores en el alperujo biodegradado. En cambio, la concentración de potasio y de sodio fue significativamente menor en el producto final. Este descenso, correlacionado con una disminución de la conductividad (Figura III. 7), y también observado en otros procesos de biodegradación de residuos orgánicos por lombrices (Elvira y col., 1998; Kaushik y col., 2005; Nogales y col., 2005) sería atribuido al lavado de este elemento soluble en las aguas de lixiviación que percolaron en los recipientes. Benítez y col (1996) encuentran que los lixiviados generados en los procesos de vermicompostaje contienen elevadas concentraciones de potasio, así como una elevada salinidad.

III.2.5.4. MICRONUTRIENTES

Tabla III.3. Concentración de micronutrientes en el alperujo natural (A) y alperujo biodegradado por *E. foetida* (AE). Valores medios de tres repeticiones

Fe mg kg ⁻¹		Mn mg kg ⁻¹		Cu mg kg ⁻¹		Zn mg kg ⁻¹	
A	AE	A	AE	A	AE	A	AE
419	2457*	12	60*	9	22*	10	56*

* Para cada elemento, * indica una diferencia significativa (P <0.05) entre A y AE

La biodegradación del alperujo por *E. foetida* aumento de forma significativa los niveles de micronutrientes (hierro, manganeso, cobre y zinc) (Tabla III.3). Los aumentos más elevados se observaron para el caso del hierro, mientras que los menores para el cobre. Estos aumentos estarían relacionados, al igual que ocurrió para el fósforo, con el proceso de mineralización de la materia orgánica durante ese proceso, cuya transformación en CO₂ y en biomasa de lombrices provocaría la concentración de los micronutrientes que, a tenor de los resultados obtenidos, escasamente serían eliminados por lavado.

III.2.5.5. FITOTOXICIDAD DEL ALPERUJO AL INICIO Y AL FINAL DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN POR *E. foetida*.

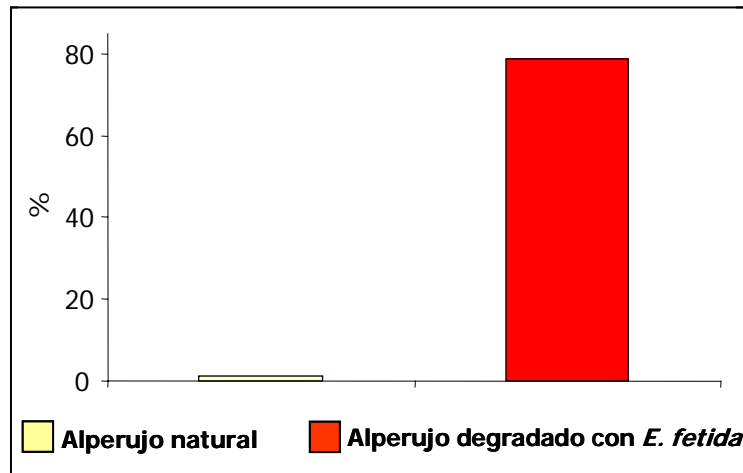


Figura III.9. Índice de germinación de *Lepidium sativum*, L. en extractos acuosos del alperujo natural y alperujo biodegradado por *E. foetida*. Valores medios de cinco repeticiones.

El proceso de biodegradación del alperujo con *E. foetida* se mostró muy eficaz para eliminar la acusada fototoxicidad que presenta ese residuo oleícola. El alperujo biodegradado tuvo un índice de germinación del 79%, superior al límite del 60% establecido para considerar a una enmienda orgánica como carente de fitotoxicidad y como madura (Zucconi y *col.*, 1981a; Riffaldi y *col.*, 1986). La eliminación de la fototoxicidad del alperujo sería debida a la drástica reducción de los compuestos fenolicos contenidos en el alperujo. Además de ello, el aumento de niveles de nitrógeno y fosforo en el producto final así como su menor salinidad aumentarían la germinación de las semillas de berro ensayadas. Comparativamente, el alperujo biodegradado por *E. foetida* presentó un mayor índice de germinación que el biodegradado con *P. ostreatus*, aunque el contenido en polifenoles totales extractables de ambos productos fueron similares. Esa diferencia podría ser debida a que en el caso de la biodegradación con lombrices no aparecerían en el sustrato productos de la oxidación de la reacción de la lacasa, lo cual si podría haber acontecido cuando actúa el hongo (apartado II.3)

IV. BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO POR *PLEUROTUS OSTREATUS* Y *EISENIA FOETIDA*



IV.1. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.1. MATERIALES

- Alperujo biodegradado previamente por el hongo *Pleurotus ostreatus* (producto final obtenido en el capítulo II de la presente memoria de Tesis Doctoral).
- Lombrices cliteladas y no cliteladas de la especie *Eisenia foetida* (Bouché, 1972) procedentes del stock mantenido en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.

IV.1.2. PREPARACIÓN DE LOS RECIPIENTES

Doscientos gramos (peso seco) de alperujo biodegradado por *P. ostreatus* fue colocado, por triplicado, en recipientes de PVC, de 12 cm de diámetro y 12 cm de altura. En cada recipiente se colocó una fina esponja circular en el fondo para facilitar su drenaje, depositándose sobre ella el alperujo biodegradado. Debido a la naturaleza no agresiva del alperujo fungidegradado para las lombrices, no fue necesario incorporar una capa de aclimatación para ellas, por lo que esos anélidos fueron inoculados directamente en el sustrato orgánico (Figura IV.1).

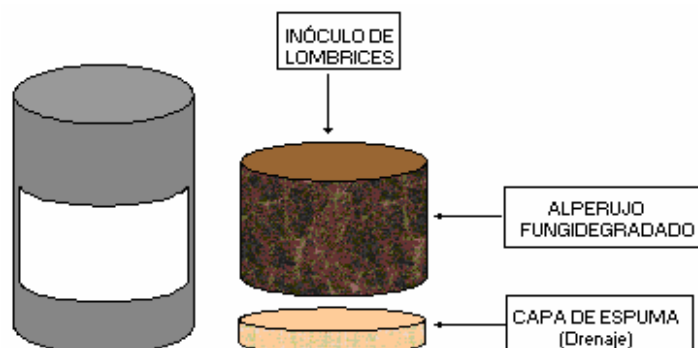


Figura IV.1. Recipiente utilizado para el desarrollo del proceso biodegradación con lombrices del alperujo degradado previamente con *P. ostreatus*

IV.1.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En cada recipiente se introdujo una biomasa de lombriz total equivalente al 10% del peso seco de sustrato (20 g de lombrices) que equivalían a 38 individuos. El 20% de estos individuos fueron lombrices cliteladas (0,7-1 g) y el resto lombrices no cliteladas (0,2-0,5 g). Una vez inoculadas las lombrices, el material se lleva a una humedad comprendida entre el 80-85%. Posteriormente los

recipientes fueron tapados con una tela fina que permite el intercambio gaseoso con el exterior y la posible huida de las lombrices. Todo el proceso se lleva a cabo en una cámara de vermicompostaje en condiciones de oscuridad y temperatura controlada (25°C). La humedad de los sustratos se mantuvo constante mediante riegos periódicos con un pulverizador de agua.



Figura 4.1. Determinación de biomasa v número de lombrices.

Quincenalmente, y durante un periodo de 4 meses se realizaron muestreos para la determinación de la biomasa total, número de lombrices y grado de desarrollo y presencia de clitelo en ellas. Para ello se utilizó el procedimiento descrito en el apartado III. 1.3. de esta memoria de tesis doctoral (Figura IV.2). Mensualmente, de cada recipiente se tomaron muestras del sustrato orgánico que fue almacenada en recipientes de plástico y conservada a 4 °C para su posterior análisis.

Al final del periodo experimental, y tras pesarlas y clasificarlas, las lombrices fueron devueltas al stock del que inicialmente se recogieron. El producto final (alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y *E. foetida* o vermicompost de alperujo predegradado por *P. ostreatus*) fue retirado. Una parte del sustrato fue secado al aire y guardado en bolsa para e su análisis químico y fitotóxico. La otra parte se guardó en bolsas a 4°C para su análisis enzimático.

IV.1.4 ANÁLISIS EFECTUADOS MENSUALMENTE DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN POR *E. foetida* DEL ALPERUJO FUNGIDEGRADADO

Mensualmente, y durante un periodo de cuatro meses, se efectuaron los siguientes análisis en el material orgánico contenido en cada recipiente:

- Carbono Orgánico Total, según método II.1.4.3.
- Carbono Hidrosoluble, según método II.1.4.4.
- Carbono extraíble total, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, según método II.1.4.5.
- Polifenoles Totales Extractables, según método II.1.4.6
- Actividad Deshidrogenasa, según método II.1.4.7.1.
- Actividad β -Glucosidasa, según método II.1.4.7.2.
- Actividad Fosfatasa, según método II.1.4.7.3.
- Actividad Ureasa, según método II.1.4.7.4.

IV.1.5. ANÁLISIS DE LOS SUSTRATOS INICIALES Y PRODUCTOS FINALES DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN POR *E. FOETIDA* DEL ALPERUJO FUNGIDEGRADADO

En el sustrato inicial y producto final obtenido después de cuatro meses de biodegradación por *E. foetida* se efectuaron los siguientes análisis:

- pH, método II.1.4.1.
- Conductividad Eléctrica, según método II.1.4.2.
- Nitrógeno Kjeldahl total, según método II.1.4.8.1.
- Análisis de otros elementos, según método II.1.4.8.2
- Mineralización Nítrico-Perclórica de las muestras, según método II.1.4.8.2.1.
- Fósforo Total del Mineralizado, según método II.1.4.8.2.2.
- Potasio Total del Mineralizado, según método II.1.4.8.2.3.
- Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, según método II.1.4.8.2.4.
- Análisis de la fitotoxicidad, según método II.1.4.9.

IV.1.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En el experimento se siguió un diseño de bloques al azar. El efecto de cada uno sustratos orgánicos durante el proceso de vermicompostaje, así como al inicio y final del mismo, se determinó mediante análisis de la varianza y test de Duncan ($P < 0.05$) utilizando el programa STATGRAPHICS Plus (Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ).

IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.2.1. EVOLUCION DE LA BIOMASA TOTAL Y NUMERO DE LOMBRICES DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO POR *P. ostreatus* Y *E. foetida*.

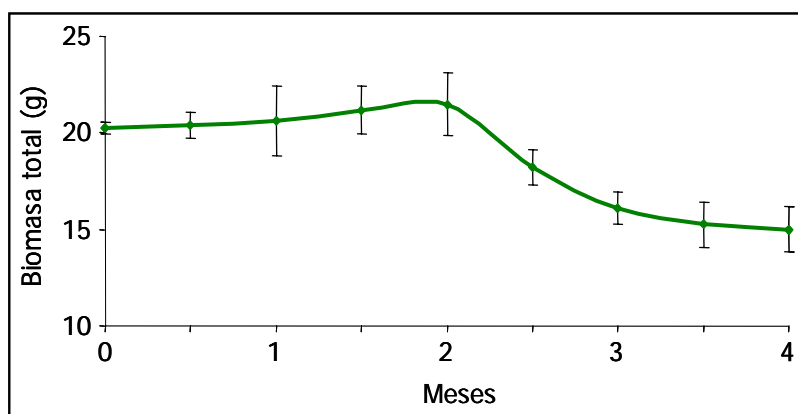


Figura IV.3. Evolución de la biomasa de lombrices durante el proceso de biodegradación del alperujo degradado con *P. ostreatus*. Valores medios de tres repeticiones

No se observó mortalidad en ninguna de las lombrices inoculadas en el alperujo biodegradado por *P. ostreatus*. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en el alperujo natural la biomasa total de las lombrices experimentó solo un leve aumento, que alcanzó su máximo a los 2 meses de su inoculación (21,5 g) (Figura IV.3). Porcentualmente, los aumentos de biomasa observados en este estudio fueron menores a los registrados por Singh y Sharma (2002) en un estudio en el que biodegradaba, con *E. foetida*, paja de trigo previamente descompuesta con *Pleurotus sajor-caju*. Desde el segundo mes y hasta el final del experimento la biomasa total disminuyó acusadamente, alcanzando un valor (15 g) sensiblemente inferior a la biomasa inoculada inicialmente. Respecto a la evolución del número de lombrices, prácticamente se mantuvo constante hasta el segundo mes, aunque se observó un aumento porcentual de las lombrices cliteladas que alcanzó el 50% del total (Figura IV.4). Desde el segundo mes y hasta el final del experimento la tendencia observada fue similar a la registrada en el alperujo natural (apartado III.2.1): un acusado aumento del número total de lombrices que no tuvieron clitelo. La pérdida de biomasa y la existencia exclusiva de lombrices no cliteladas y de pequeño tamaño (0,05-0,15 mg) al final del periodo experimental implicaría que los escasos recursos nutricionales contenidos en el alperujo biodegradado previamente por *P. ostreatus* habían sido agotados. Por tal motivo, y aunque inicialmente la duración de este experimento se había programado para seis meses, hubo de interrumpirse ya que el sustrato ensayado habría sido ya biodegradado.

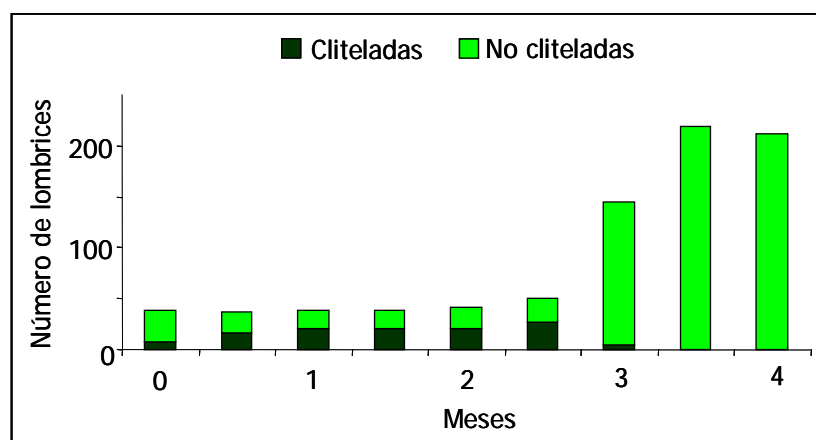


Figura. IV.4. Evolución del número total de lombrices cliteladas y no cliteladas durante el proceso de biodegradación del alperujo natural. Valores medios de tres repeticiones

El leve aumento de la biomasa total y la rápida aparición de lombrices no cliteladas pondría de manifiesto que el alperujo biodegradado con *P. ostreatus* posee una escasa capacidad para sustentar y desarrollar un cultivo de lombrices epigeas. Este hecho, que no aconteció para el caso del alperujo natural, sería debida a que los recursos nutricionales contenidos en ese residuo oleícola habrían sido ya metabolizados durante su biodegradación por hongos, quedando una escasa cantidad de esos recursos disponibles para las lombrices.

IV.2.2. EVOLUCIÓN DEL CARBONO HIDROSOLUBLE Y POLIFENOLES EXTRAIBLES TOTALES DURANTE LA BIODEGRADACIÓN POR *E. foetida* DEL ALPERUJO DEGRADADO POR *P. ostreatus*

La evolución del carbono hidrosoluble durante la biodegradación por *E. foetida* del alperujo fungidegradado siguió una tendencia similar a la observada en el caso del alperujo natural: Descenso significativo de los niveles de este carbono durante los 2 primeros meses (de 68 a 24 gC kg⁻¹) y posterior estabilización hasta el final del periodo experimental (Figura IV.5). El descenso observado indicaría que aunque el alperujo utilizado ya había sido parcialmente degradado por *P. ostreatus*, aun contiene una apreciable fracción de materia orgánica fácilmente metabolizable, que rápidamente fue degradada por la acción combinada de las lombrices y microorganismos (García y col., 1994, Benítez y col., 1999). Después de 4 meses de biodegradación, los valores de carbono hidrosoluble fueron de 25 g kg⁻¹, ligeramente superiores a los registrados cuando se utiliza como sustrato alperujo natural (Figura IV.5)

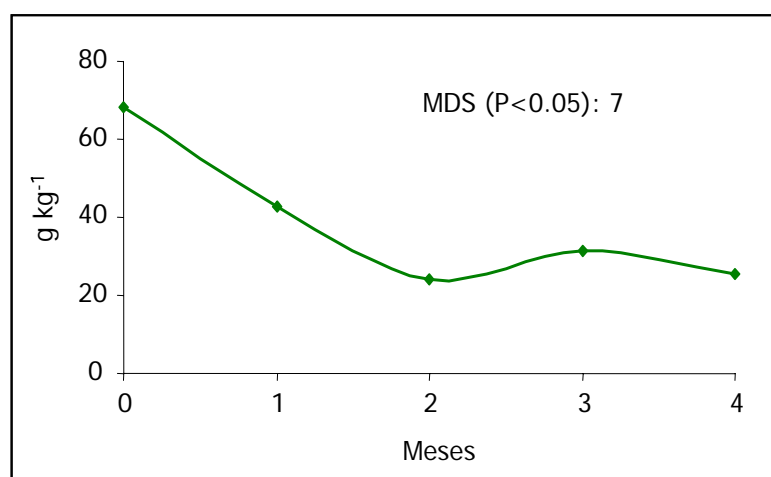


Figura IV.5. Evolución del carbono hidrosoluble durante el proceso de biodegradación por *E. foetida* del alperujo fungidegradado. Valores medios de tres repeticiones

Los niveles de polifenoles extractables totales en el sustrato inicial eran muy bajos (2,6 g kg⁻¹), debido a la eliminación de esos compuestos durante la biodegradación del alperujo por *P. ostreatus* (apartado II.2.3). Al mes de la inoculación de ese sustrato con las lombrices ensayadas no se detectaron, por la metodología utilizada, valores de esos compuestos en el sustrato orgánico.

IV.2.3. EVOLUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO FUNGIDEGRADADO POR *E. foetida*

A diferencia de lo observado en el alperujo natural donde su elevado contenido en polifenoles había inhibido la actividad deshidrogenasa, en el degradado por *P. ostreatus* esa actividad era mayor.

IV. Alperujo biodegradado por *P.ostreatus* y *E. foetida*

La evolución de esta actividad siguió una tendencia similar a la registrada en el alperujo natural, ajustándose al igual que aquella, significativamente a una curva de segundo grado. La biodegradación del alperujo fungidegradado por *E. foetida* aumentó, al igual que ocurría con el alperujo natural, esa actividad, que alcanzó el máximo ($203 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) (Tabla IV.1). Los valores durante este segundo mes fueron menores que los registrados en el experimento de biodegradación del alperujo natural con lombrices (Tabla III.1) lo cual implicaría una menor actividad hidrolítica inducida por las lombrices así como la existencia de una menor biomasa microbiana en el alperujo biodegradado previamente con *P. ostreatus*. Posteriormente, la actividad deshidrogenasa disminuyó significativamente, alcanzando valores, al final del periodo de biodegradación de $117 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$; niveles apreciablemente inferiores a los registrados en el proceso de biodegradación del alperujo natural ($248 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Este descenso, al igual que sucedía anteriormente, se encuentra relacionado con la desaparición de los compuestos carbonados más fácilmente metabolizables (Figura IV.5) (Bansal y Kapoor, 2000).

Tabla IV.1. Cambios en las actividades enzimáticas durante el proceso de biodegradación del alperujo por *E. foetida*. Valores medios de tres repeticiones. Los valores en actividad enzimática seguidos con la misma letra no son significativos A $P < 0.05$. ($P < 0.05$)

Meses		0	1	2	3	4
Dshidrogenasa	$\mu\text{gINTF g}^{-1}\text{h}^{-1}$	59d	139b	203a	128bc	117c
β-Glucosidasa	$\text{mgPNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$	278c	201c	264c	545a	428b
Fosfatasa	$\text{mgPNP g}^{-1}\text{h}^{-1}$	145a	94d	115c	128bc	138ab
Ureasa	$\mu\text{g NH}_4 \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$	737d	3371a	3520a	2618b	2129c

La actividad β -glucosidasa tendió a aumentar a lo largo del periodo de biodegradación, ajustándose su evolución a una curva lineal. Ese aumento fue más acusado durante los dos últimos meses del proceso de biodegradación. La evolución de la actividad β -glucosidasa registrada contrasta con lo observado en el experimento previo de biodegradación del alperujo natural (apartado III.2.4) así como lo generalmente observado en procesos de vermicompostaje utilizando otros residuos orgánicos (Benítez y col., 1999; Nogales y col., 2005) y procesos de compostaje (Díaz-Burgos y col., 1992), donde esa actividad, después de un aumento durante los primeros estadios del proceso, tiende a disminuir al final de él. Los aumentos observados al final del periodo experimental indicarían una mayor liberación de glucósidos en este periodo y, además, dejaría patente que esta enzima se encontraría parcialmente inmovilizada y estabilizada en la matriz orgánica del alperujo previamente degradado por *P. ostreatus*, lo cual impediría su degradación o desnaturalización durante el proceso de biodegradación con *E. foetida* (Burns, 1982; Romero y col., 2005).

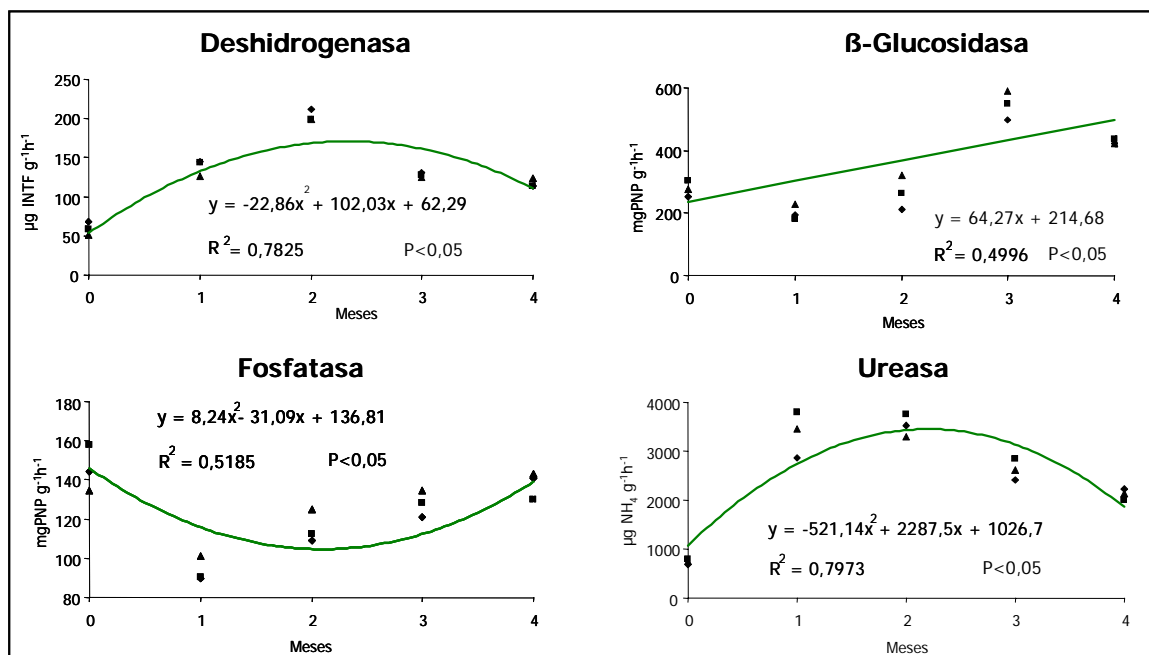


Figura IV.6. Evolución de las actividades enzimáticas durante el proceso de biodegradación por *E. foetida* del alperujo biodegradado previamente por *P. ostreatus*.

La actividad fosfatasa disminuyó significativamente durante el primer mes de biodegradación, y a partir de éste tiende a aumentar alcanzando al final del periodo experimental valores similares a los iniciales. Esta dinámica que se ajusta a una ecuación negativa de segundo grado, vendría condicionada por la posible presencia de fósforo inorgánico soluble aun presente en el sustrato inicial, el cual inhibe la síntesis de la actividad fosfatasa (Nannipieri y col., 1990). La posterior liberación compuestos orgánicos fosforados entre otros ésteres-fosfatos por la acción combinada de lombrices y microorganismos podría explicar este aumento, al tratarse de un enzima inducible (Burns, 1982; Nannipieri et al., 1990).

Los valores de la actividad ureasa durante el proceso de biodegradación por *E. foetida* del alperujo fungidegradado fueron muy elevados, superiores a los observados en los dos experimentos precedentes (apartados II. Y III.2.4) y en otros procesos de vermicompostaje (Benítez y col., 1999, Nogales y col., 2005). Ello sugiere la presencia durante todo el proceso de biodegradación de una importante cantidad de compuestos orgánicos nitrogenados que inducirían la síntesis de este enzima. La evolución de la actividad ureasa siguió una curva de segundo grado, que además de correlacionarse linealmente con la actividad deshidrogenasa ($p > 0,05$) fue similar a la observada en el experimento de biodegradación del alperujo natural. Los mayores valores de esta actividad se alcanzaron al segundo mes de la inoculación de las lombrices, y aunque esa actividad disminuyó significativamente al final del periodo experimental, los elevados valores aún registrados ($2129 \mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$) indicaría que todavía quedan en el alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y *E. foetida* sustratos nitrogenados asimilables por los microorganismos que podrían sintetizar este enzima.

IV.2.4. EVOLUCIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL, CARBONO EXTRAIBLE TOTAL Y SUSTANCIAS HÚMICAS DURANTE LA BIODEGRADACIÓN POR *E. foetida* DEL ALPERUJO DEGRADADO POR *P. ostreatus*

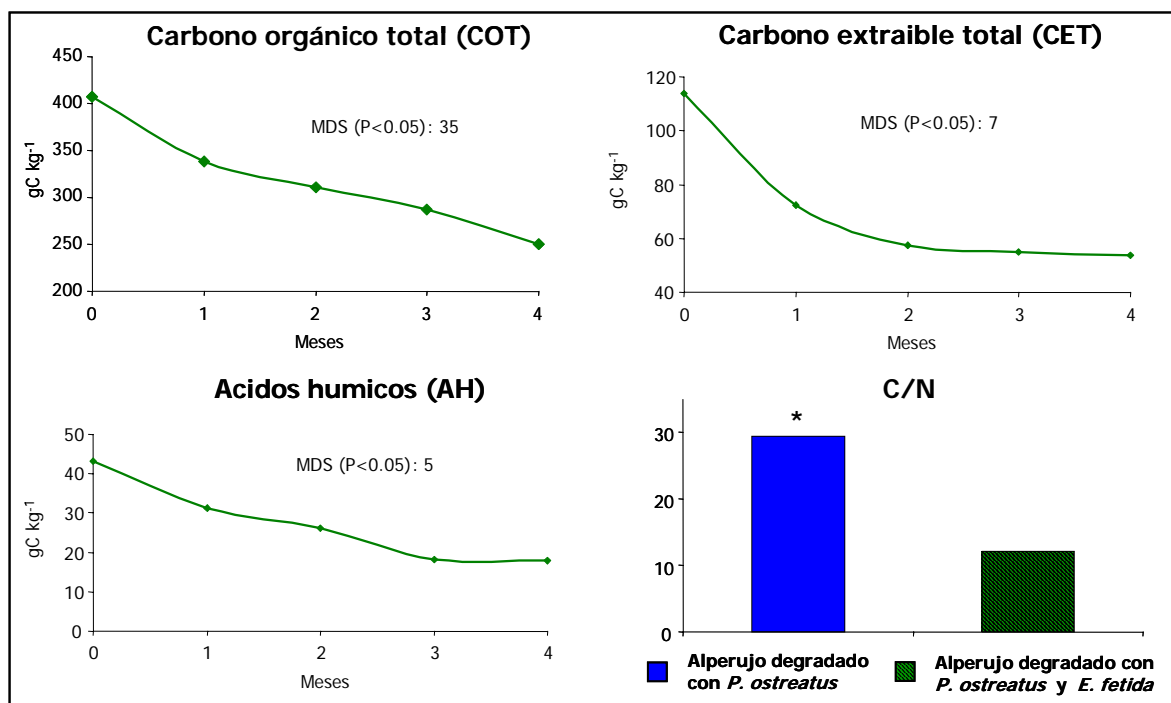


Figura IV.7. Evolución de las fracciones orgánicas durante el proceso de biodegradación por *E. foetida* del alperujo biodegradado previamente por *P. ostreatus* y relación C/N en alperujo natural y alperujo biodegradado por *E. foetida*. Valores medios de tres repeticiones. En la relación C/N, el asterisco indica una diferencia significativa (P<0,05) entre el alperujo inicial y biodegradado.

El contenido del carbono orgánico total del alperujo degradado por *P. ostreatus* disminuyó acusadamente por la acción de las lombrices sobre ese sustrato (Figura IV.7). Esta reducción debida a la mineralización de la materia orgánica y la pérdida del carbono orgánico como CO₂, fue porcentualmente mayor (40) que la ocasionada durante la biodegradación del alperujo natural inducida por las lombrices. Esta disminución del carbono orgánico total es el testigo de la acción sinérgica entre *E.foetida* y *P.ostreatus* en la degradación de alperujo, ya que no se está frente a un subproducto recalcitrante a la degradación, por su alto contenido en polifenoles y lignina (Romero y col., 2003), y por presentar una relación C/N desfavorable para el desarrollo de los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica, sino que se está ante un residuo de fácil degradación por los anélidos y microorganismos y con bajos contenidos en compuestos tóxicos. Esta acción sinérgica puede ser explicada a través del aporte enzimático que proporcionó *P.ostreatus* sobre el alperujo, principalmente fenoloxidasas, celulasas y ligninoperoxidasas, que hicieron desaparecer las características recalcitrantes del alperujo. Por su parte las lombrices al encontrarse en un sustrato orgánico no tóxico pueden desarrollar su acción detritívora sobre el sustrato, así como aportar la

secreción de enzimas hidrolíticos por la microflora del tubo digestivo que permitirán seleccionar poblaciones de microorganismos capaces de acelerar el proceso de mineralización de la materia orgánica (Whiston y Seal, 1988; Kavian y Ghatneker, 1991).

Los niveles de carbono total extraíble y los de ácidos húmicos también disminuyeron acusadamente por la acción combinada de las lombrices y microorganismos (Figura IV.7), tal como se puso de manifiesto en el experimento de biodegradación con alperujo natural. Porcentualmente, los descensos del CET y de los AH fueron de un 52 y 58%, respectivamente, superiores a los registrados en el alperujo natural biodegradado por lombrices (30 y 41% respectivamente). Las disminuciones observadas tuvieron lugar de forma significativa durante los 2 primeros meses de la biodegradación, mientras que en los 2 últimos se observó una tendencia a la estabilización. Aunque y tal como se explicó en el apartado III.2.5.2 la biodegradación de un sustrato orgánico por lombrices o vermicompostaje debería haber favorecido la estabilización y la humificación de la materia orgánica, que se hubiera traducido en un aumento de los niveles de carbono extraíble y ácidos húmicos de ese sustrato, ello no tuvo lugar en los experimentos en los que se utilizó alperujo. La explicación habría que atribuirlo a la presencia, no solo en el alperujo natural si no también en el biodegradado con *P. ostreatus* de compuestos fácilmente degradables que se extraerían con las sustancias húmicas y por ello ser cuantificadas como tales (apartado II.5.2.).

La disminución del contenido total de carbono orgánico por mineralización y el aumento de la concentración del nitrógeno Kjeldahl total (Tabla IV.2) provocó una significativa reducción de la relación C/N en el alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y *E. foetida* respecto al alperujo natural (Figura IV.8). Descensos de la relación C/N han sido siempre observados en todos los procesos de vermicompostaje, independientemente del tipo de residuo o sustrato orgánico ensayado (Kale y col., 1982; Edwards, 1988; Talashilkar y col., 1999). La relación C/N (22) del alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y *E. foetida*, fue menor que la registrada en el alperujo biodegradado por *P. ostreatus* (29), y le conferiría a éste producto un excelente grado de estabilidad y un gran valor agronómico. Según Senesi (1989), enmiendas orgánicas con una relación C/N inferior a 20 indica un grado de estabilización de la materia orgánica adecuado, y a su vez un satisfactorio grado de madurez.

IV.2.5. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEL ALPERUJO DEGRADADO CON *P. ostreatus* AL INICIO Y AL FINAL DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN CON *E. foetida*

IV.2.5.1. PH Y CONDUCTIVIDAD

El alperujo biodegradado por *P. ostreatus* presentaba un pH cercano a la neutralidad. La biodegradación de este sustrato por *E. foetida* aumentó significativamente el pH a valores de 8,1 (Figura IV.8). Esa misma tendencia fue observada cuando se biodegradó alperujo natural con lombrices (apartado (III.5.2.1), donde los valores al final del proceso fueron incluso más altos. En otros estudios, se han observado tanto aumentos como descensos del pH durante el desarrollo de procesos de vermicompostaje (Albanell y col., 1988; Datar y col., 1997; Elvira et al., 1996, 1998;

Hartenstein and Hartenstein, 1981; Mitchell, 1997; Nogales y col., 1999, 2005). Según Nedgwa (2000) los cambios del pH son dinámicos y dependientes del tipo de sustrato orgánico ensayado y de la densidad de la población de lombrices inoculada durante el proceso de biodegradación. La aparición de productos intermediarios ácidos durante la biodegradación y la posterior asimilación de ellos por las lombrices y microorganismos conlleva que la dinámica del pH durante el proceso pueda ser reversible.

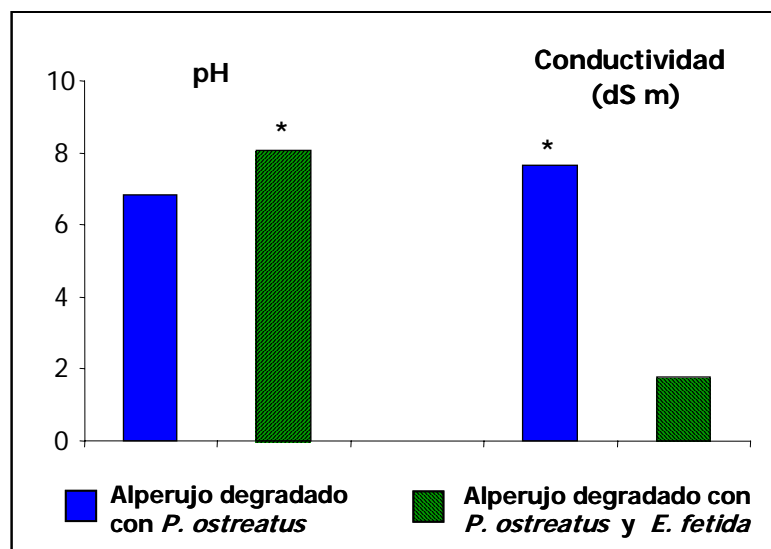


Figura IV.8. pH y conductividad en alperujo degradado con *P. ostreatus* y el alperujo degradado con *P. ostreatus* y *E. foetida*. Valores medios de tres repeticiones. En cada parámetro, asterico sobre columna indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el alperujo natural y biodegradado.

Al igual que lo observado en la biodegradación de alperujo natural por *E. foetida*, la conductividad del alperujo predegradado con *P. ostreatus* disminuyó significativamente por la acción combinada de lombrices y microorganismos (Figura IV.8). Comparativamente el alperujo degradado por *P. ostreatus* y *E. foetida* presentó una menor conductividad (1,8) que la del alperujo degradado exclusivamente por *E. foetida* (3,3). Las causas de esta apreciable disminución habría que atribuirla, como se indicó anteriormente, al lavado de las sales por las aguas que percolaron.

IV.2.5.2. MACRONUTRIENTES, SODIO Y MICRONUTRIENTES.

Las concentraciones de nitrógeno, calcio hierro, manganeso cobre y zinc del producto final fueron significativamente más elevadas que en el sustrato inicial (Tabla IV.2). Esos aumentos, como se indicó en los apartados III.2.5.3 y III.2.5.4, serían debidos, mayoritariamente, a un efecto de concentración de esos elementos en el sustrato debido a la pérdida de materia orgánica como CO_2 durante el proceso de biodegradación (Elvira y col., 1998; Kaviraj y col., 2003; Nogales y col., 1999). Porcentualmente, los aumentos observados en esos nutrientes fueron apreciablemente menores que

los registrados en el estudio de biodegradación del alperujo natural por lombrices (apartado III.2.5.3). Además, y a diferencia de lo observado en ese estudio, la concentración de fósforo total disminuyó en un 27%. Ello indicaría que parte del fósforo contenido en el alperujo degradado por *P. ostreatus* se encontraría en forma mineral soluble, lo cual no es de extrañar ya que durante la inicial inoculación del alperujo con este hongo, el sustrato fue humedecido con solución tampón de fosfato (apartado II.1.3). Este fósforo mineral podría haberse lixiviado en las aguas que percolaron de los recipientes, lo cual se traduciría en una disminución de este elemento al final del proceso de biodegradación por *E. foetida*. La lixiviación de potasio y sodio en esas aguas también explicaría la reducción de la concentración de ambos elementos en el producto final; disminución que porcentualmente fue superior a la observada en el proceso de biodegradación del alperujo natural por *E. foetida*.

Tabla IV.2. Concentración de macronutrientes, micronutrientes y sodio en el alperujo predegradado con *P. ostreatus* (AP) y alperujo biodegradado con *P. ostreatus* y *E. foetida* (APE). Valores medios de tres repeticiones

N g kg ⁻¹		P g kg ⁻¹		K g kg ⁻¹		Ca g kg ⁻¹		Mg g kg ⁻¹	
AP	APE	AP	APE	AP	APE	AP	APE	AP	APE
14	21*	11*	8	21*	5,7	27	34*	4,2	4,1
Na mg kg ⁻¹		Fe mg kg ⁻¹		Mn mg kg ⁻¹		Cu mg kg ⁻¹		Zn mg kg ⁻¹	
AP	APE	AP	APE	AP	APE	AP	APE	AP	APE
1036*	436	1820	2215*	43	49*	22	29*	33	38*

* Indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre AP y APE para cada elemento

IV.2.5.4. FITOTOXICIDAD DEL ALPERUJO PREDEGRADADO CON *P. OSTREATUS* AL INICIO Y AL FINAL DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN POR *E. FOETIDA*

Aunque el alperujo predegradado con *P. ostreatus* poseía una escasa fototoxicidad (41%), la acción combinada de lombrices y microorganismos la eliminó completamente, ya que el índice de germinación de semillas de berro, alcanzó un óptimo cercano al 100%. Este aumento, además de la posible eliminación de los compuestos fitotóxicos aun presentes en alperujo degradado con *P. ostreatus*, se encontraría relacionado con la escasa salinidad presente en el producto final, así como con su óptima relación C/N; factores que favorecerían la óptima germinación de las semillas ensayadas.

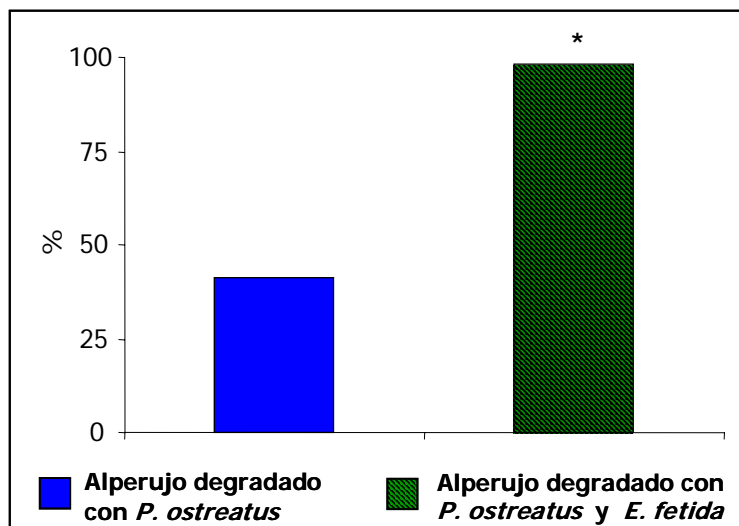


Figura IV.9. Indice de germinación de *Lepidium sativum*, *L.* en extractos acuosos del alperujo predegradado con *P. ostreatus* y alperujo biodegradado con *P. ostreatus* y *E. foetida*. Valores medios de cinco repeticiones. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0,005$) entre ambos productos

**V. ESTUDIO SECUENCIAL DE LA BIODEGRADACIÓN DEL ALPERUJO,
NATURAL O MEZCLADO CON PAJA, MEDIANTE INOCULACIÓN CON
*Pleurotus ostreatus***



V.1. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1.1. RESIDUOS ORGÁNICOS

- Alperujo u orujo procedente de la extracción del aceite de oliva mediante proceso de centrifugación por dos fases suministrado por la empresa Romeroliva, Deifontes, Granada.
- Paja de cebada suministrada por el cortijo "La Parra", Deifontes, Granada

V.1.2. HONGO

Se utilizó una cepa de *Pleurotus ostreatus* de la empresa Amycel (# 3020 dsv7240), la cual se cultivó en placa de Petri con medio Agar PDA, a 25 °C en oscuridad durante 15 días, hasta obtener el micelio joven requerido para preparar el inóculo.

V.1.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para obtener el inóculo se tomaron unidades de 500 gramos de trigo, se llevaron a ebullición en agua durante 15 minutos, luego se drenaron, dejaron enfriar y secaron al aire en una superficie adsorbente. Una vez seco, el trigo fue mezclado con 1,75 g de CaCO₃ y 6,3 g de yeso. La mezcla se dispuso en frasco de vidrio y se esterilizó a 121 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar, y en campana de flujo laminar se sembró un trozo de micelio joven de *P.ostreatus*, de 1cm x 1cm, proveniente del inóculo obtenido en placa de Petri. Posteriormente se incubó a 25 °C en oscuridad hasta que el micelio cubrió completamente este sustrato.

V.1. 4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización del experimento de biodegradación secuencial se ensayaron 4 tratamientos que estuvieron constituidos por los siguientes sustratos orgánicos:

A: Un kilogramo de alperujo u orujo dos fases secado al aire.

AP (1:1): Mezcla de 500 g de alperujo (p.s.) y 500 g de paja de cebada (500 g)

AP (2:1): Mezcla de 666,6 g de alperujo (p.s) y 333,4 g de paja de cebada

P: Un kilogramo de paja de cebada

Cada sustrato orgánico, por cuadruplicado, fue colocado en bolsa transparente de polietileno previamente esterilizada. A cada sustrato se agregó 1-2 % de CaCO₃ (p.s.), 1-2% de yeso, y 2% de harina de maíz (Cadavid y Cardona, 1996; Cardona y Bedoya, 1996), siendo esterilizado a 120°C durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente (Foto V.1). Posteriormente, cada uno de los

sustratos fue inoculado con el micelio del hongo *P. ostreatus* contenido en el sustrato de trigo, en una cantidad equivalente al 6 % (p.s.) y humedecido a un 84% con agua destilada estéril, llevándose a cámara oscura controlada (25 ° C), donde se mantuvo durante un periodo de 180 días. En I



Foto V.1. Dispositivos utilizados para la biodegradación de los sustratos orgánicos con *P. ostreatus* y desarrollo del micelio del hongo al final del periodo de biodegradación

V.1.5. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El diseño del experimento se realizó de acuerdo a las necesidades de control del proceso de biodegradación, para lo cual periódicamente (cada 30 días) se tomaron muestras representativas de los sustratos contenidos en cada bolsa (10 g de sustrato de cada bolsa), que fueron guardadas en receptáculos plásticos a 4°C para su posterior análisis químico y enzimático.

Mensualmente (30 días) se determinaron los siguientes parámetros: pH, polifenoles extraíbles totales, carbono hidrosoluble y actividades enzimáticas (deshidrogenasa, fosfatasa, glucosidasa, lacasa). Inicialmente, a mitad del proceso (90 días) y al final del mismo se analizó el carbono orgánico total, carbono extraíble total y ácidos húmicos. Por último, al inicio (0 días) y final del proceso (180 días), se determinaron los nutrientes y la fototoxicidad de cada uno de los sustratos ensayados.

V.1.6. METODOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE ALPERUJO, PAJA Y MEZCLAS CON *P.ostreatus*

Los métodos utilizados para la determinación de los parámetros anteriormente mencionados han sido los siguientes:

- pH, según método II.1.4.1.
- Carbono Orgánico Total, según método II.1.4.3.
- Carbono Hidrosoluble, según método II.1.4.4.
- Carbono Extraíble Total y Ácidos Húmicos, según método II.1.4.5.
- Polifenoles Totales Extractables, método II.1.4.6.
- Actividad Deshidrogenasa, según método II.1.4.7.1.
- Actividad β -Glucosidasa, según método II.1.4.7.2.
- Actividad Fosfatasa, según método II.1.4.7.3.
- Actividad Ureasa, según método II.1.4.7.4.
- Actividad Lacasa, según método II.1.4.7.5.
- Nitrógeno Kjeldahl Total, según método II.1.4.8.1.
- Mineralización nítrico-perclórica de las muestras, según método II.1.4.8.2.1
- Fósforo Total del Mineralizado, según método II.1.4.8.2.2.
- Potasio Total del Mineralizado, según método II.1.4.8.2.3.
- Calcio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, según método II.1.4.8.2.4.
- Análisis de la fitotoxicidad, según método II.1.4.9.

V.1.6.1 HEMICELULOSAS, CELULOSAS Y LIGNINAS (Goering y Van Soest, 1974)

V.1.6.1.1. COMPONENTES FIBROSOS

Se determinaron según el esquema analítico de van Soest utilizando la tecnología de Ankom Corporation®. Para ello, se emplean sacos de poliéster, libres de nitrógeno y cenizas, previamente desecados en estufa de ventilación forzada a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ y tarados, en los que se pesan 0,5 g de muestra. A continuación se sellan con calor y se agitan enérgicamente para conseguir que la muestra se reparta homogéneamente en su interior. Una vez así preparados, se colocan un total de 24 sacos sobre un suspensor, que se introduce en la cubeta de digestión del analizador (Ankom200), rellenándose ésta con 2 L de la solución correspondiente (detergente neutro o detergente ácido). La digestión tiene una duración de 60 minutos a partir del momento en que la temperatura de la solución alcanza los 100°C . Al cabo de este tiempo, se realiza el aclarado de los sacos, que consiste en tres lavados, de tres minutos de duración cada uno, con agua destilada a $90-100^\circ\text{C}$. A continuación se retiran los sacos, eliminándose el exceso de agua mediante presión y se sumergen en acetona durante otros tres minutos. Transcurrido este tiempo se elimina el exceso de acetona y se dejan secar a temperatura ambiente durante 1 hora. La desecación se completa en estufa hasta peso constante.

V.1.6.1.2. FIBRA NEUTRO DETERGENTE (FND)

El material celular soluble se extrae por ebullición durante 1 hora en una solución de detergente neutro de lauril sulfato sódico que contiene EDTA disódico. Los componentes solubles, se separan de aquellos que requieren mayor tiempo de tratamiento. El material insoluble en detergente neutro tras dicha ebullición y libre de las cenizas por calcinación a 554°C en horno mufla, constituye la fibra neutro detergente (FND). Los materiales solubles en detergente neutro o contenidos celulares se obtienen por diferencia entre 144 y el contenido porcentual de FND de la muestra expresado en materia seca.

V.1.6.1.3. FIBRA ÁCIDO DETERGENTE (FAD)

Es el residuo, constituido fundamentalmente por lignocelulosa, que se obtiene tras someter la muestra a digestión con solución de detergente ácido (bromuro de cetiltrimetilamonio) en medio sulfúrico y calcinación a 550°C en horno mufla. Ese residuo libre de las cenizas, constituye la fibra ácido detergente (FAD). El contenido en hemicelulosa se obtiene por diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra neutro y ácido detergente de la muestra expresado en materia seca.

V.1.6.1.4. LIGNINA ÁCIDO DETERGENTE (LAD)

Es el constituyente de la pared celular constituido fundamental aunque no exclusivamente, por lignina. El saco que contiene el residuo obtenido tras la incubación con detergente ácido, se sumerge en ácido sulfúrico al 72% durante 3 horas. Pasado este tiempo se lavan los sacos con agua destilada caliente hasta obtener un pH neutro en el agua de lavado, se aclaran con acetona para retirar el agua, se desecan al aire y se completa la desecación a $103 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez secos se pesan y se incineran en un horno de mufla a 550°C para determinar el contenido en cenizas. El residuo libre de cenizas constituye la fracción denominada lignina ácido detergente. La celulosa se obtiene por diferencia entre los contenidos porcentuales de fibra ácido detergente y lignina ácido detergente de la muestra correspondiente.

V.1.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los modelos factoriales de análisis de la varianza sirven para evaluar el efecto individual y conjunto de dos o más factores (variable independientes categóricas: TRATAMIENTO Y TIEMPO) sobre una variable dependiente cuantitativa (CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS). Para cada efecto existe una hipótesis y para cada hipótesis un estadístico F que permite contrastarla. El nivel estadístico F permite mantener o rechazar cada hipótesis. En un ANOVA factorial se trabaja con tantas poblaciones como casillas resultan de la combinación de todos los niveles de los factores involucrados. El modelo supone que las poblaciones son normales y homocedásticas. Asimismo, supone que las observaciones han sido aleatoriamente seleccionadas y, por tanto, son independientes entre sí.

Los estadísticos F del ANOVA únicamente permiten contrastar la hipótesis general de que los promedios comparados son iguales o no. Para determinar qué media difiere de qué otra debemos

utilizar un tipo de contraste denominados comparaciones múltiples *post hoc* o comparaciones *a posteriori*. Estas comparaciones permiten controlar la tasa de error al efectuar varias comparaciones múltiples utilizando las mismas medias, es decir, controlar la probabilidad de cometer errores cuando se decide rechazar hipótesis nulas que en realidad no deberían rechazarse. El procedimiento de múltiples comparaciones "*a posteriori*" utilizado fue la prueba de Bonferroni, la cual consiste en dividir el error alfa aceptado habitualmente (0.05), por el número de comparaciones, de forma que si hemos llevado a cabo 10 comparaciones, exigimos una probabilidad menor del 0.005 para establecer la significación estadística de las diferencias encontradas entre dos grupos.

El análisis estadístico se realizó con el programa informático STATISTICA (Tatsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA)

V.2 RESULTADOS Y DISCUSION

V.2.1. pH

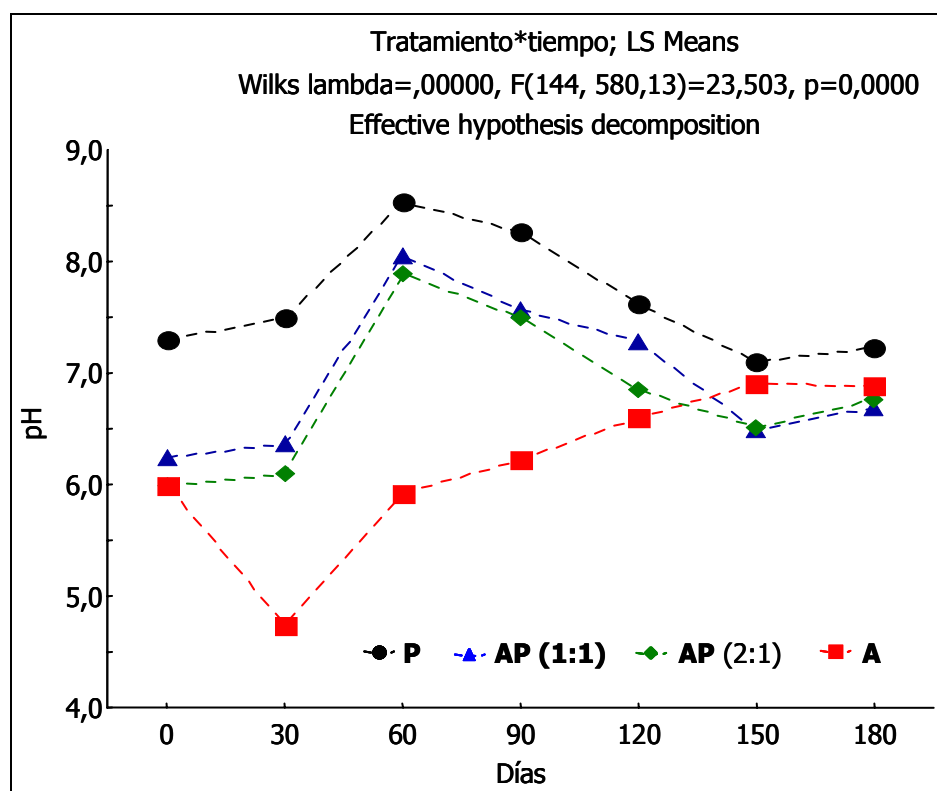


Figura V.1. Evolución del pH durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 1)

Uno de los parámetros que caracterizan al alperujo es su pH ácido, debido fundamentalmente a la presencia de ácidos grasos y alcoholes (Lanzani y Fedeli, 1986). La evolución del pH durante la

biodegradación mediada por *P. ostreatus* de la paja y del alperujo acondicionado con paja, fue similar al patrón descrito para otros procesos de estabilización -compostaje, vermicompostaje- de residuos agroindustriales (Madejón y col., 1998; Melgar, 2003). Se pueden así distinguir dos fases durante el proceso de biodegradación (Fig. V.1): una fase inicial en la cual predominarían los procesos de amonificación, que provocaría la liberación de amonio y por tanto un incremento del pH, y una segunda etapa, característica de la mineralización de la materia orgánica, en la cual predominan los procesos de nitrificación y la liberación al medio de iones hidrógeno, con la consecuente acidificación del medio (Sánchez-Monedero y col., 2001).

La excepción a esta dinámica la constituyó el sustrato que contuvo sólo alperujo, en el cual se observó una disminución inicial del pH, significativa durante los primeros 30 días, hasta alcanzar un valor de 4,7. Dicho descenso se debe probablemente al resultado de la hidrólisis ácida que *Pleurotus* lleva a cabo sobre los polifenoles presentes en él (Amhajji y col., 2000), liberando iones H^+ . A partir del mes de biodegradación, el pH se incrementó hasta alcanzar, como en el resto de los sustratos ensayados, valores próximos a la neutralidad.

V.2.2. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT)

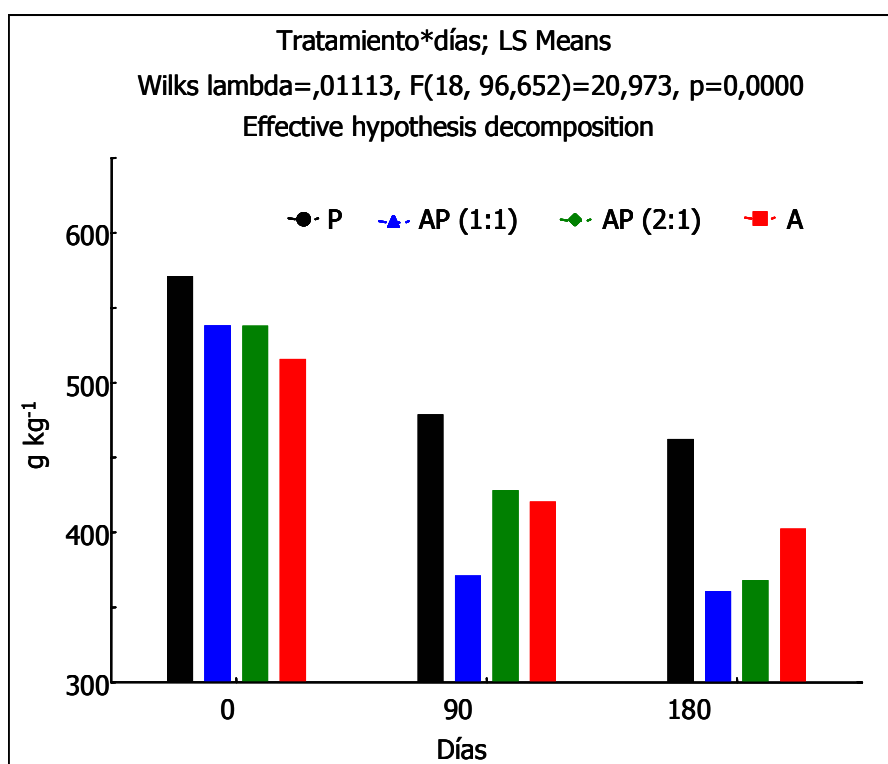


Figura V.2. Evolución del carbono orgánico total durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 2)

En todos los sustratos ensayados se evidenció el efecto de *P. ostreatus* sobre la degradación del carbono orgánico, especialmente durante los primeros 90 días (Fig. V.2). El proceso de mineralización de

la materia orgánica mediado por este hongo provocó una disminución significativa de los niveles de carbono orgánico total, estimado en un 19% en la paja, 33% en la mezcla alperujo-paja (1:1), 32% en la mezcla alperujo-paja (2:1) y 22% en el alperujo.

Los resultados evidenciaron la capacidad de *P. ostreatus* para colonizar y, posteriormente degradar, sustratos orgánicos con elevada relación C/N (Tabla V.2). Además de ello, el alperujo, presenta una elevada cantidad de polifenoles totales (37-40 g/kg) que dificultan e impiden en muchos casos la actividad de los microorganismos implicados en la degradación de la materia orgánica (Pérez y col., 1992; Casa y col., 2003). Los resultados ponen de manifiesto que *P.ostreatus*, a través de la actividad enzimática hidrolítica que lo caracteriza -fenoloxidasas, celulasas y ligninoperoxidasas-, fue capaz de degradar la mayoría de los compuestos recalcitrantes de los sustratos empleados -paja y alperujo- que hacen difícil su degradación microbiológica.

V.2.3. CARBONO HIDROSOLUBLE

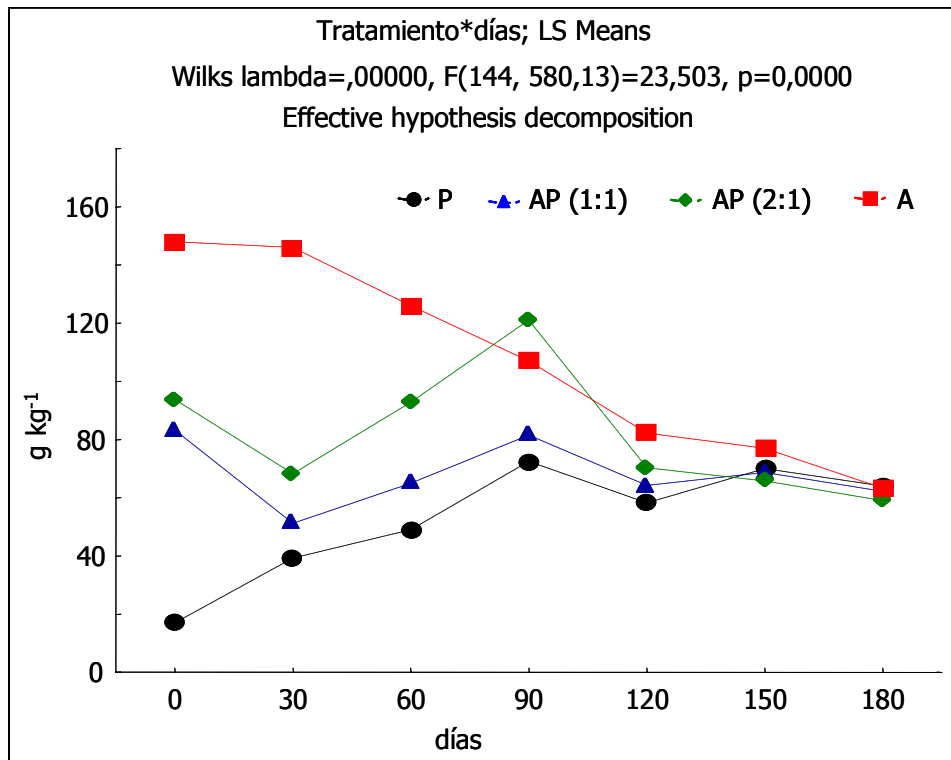


Figura V.3. Evolución del carbono hidrosoluble durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 3)

El carbono soluble constituye la fracción orgánica más fácilmente metabolizable por los microorganismos (García y col., 1994; Wagai y Sollins, 2002). En el alperujo, la fracción hidrosoluble está compuesta fundamentalmente por carbohidratos, siendo la glucosa el monosacárido más abundante (Felizón y col., 2000). Estos compuestos son degradados rápidamente en procesos de biorremediación de residuos orgánicos tales como compostaje o vermicompostaje (Pichler y col.,

2001; Benítez y col., 2005). Por el contrario, la paja presentó una menor cantidad de estos compuestos carbonados fácilmente asimilables (Fig. V.3).

La disminución significativa del carbono hidrosoluble durante el proceso de degradación de los sustratos que contenían alperujo, indicó el consumo de la mayoría de los carbohidratos asimilables (Tabla V. 4), tendencia que se mantuvo hasta alcanzar un periodo de estabilización en el que se equilibraron los procesos de liberación y consumo de esta fracción orgánica. En la paja, por el contrario, predominaron los procesos de liberación de compuestos asimilables al medio hasta alcanzar igualmente un equilibrio en los últimos meses del proceso.

Los resultados evidenciaron la capacidad de *P. ostreatus* para iniciar la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes contenidos en residuos como alperujo y paja, liberándose sustancias más fácilmente asimilables por los microorganismos. Este fenómeno, típico de los procesos de estabilización de residuos lignocelulósicos, ha sido caracterizado también por otros autores en procesos de biodegradación de alperujo mediante el uso de lombrices de tierra (Benítez y col., 2002, 2005)

V.2.4. CARBONO EXTRAIBLE TOTAL Y ÁCIDOS HÚMICOS

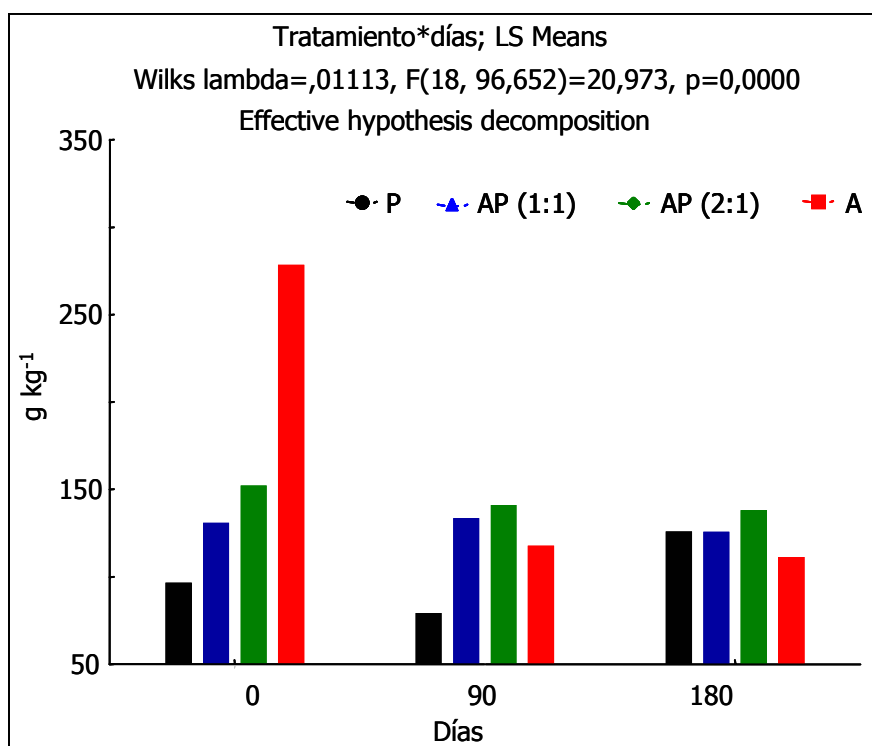


Figura V.4. Evolución del carbono extraíble total durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 4)

El carbono extraíble con pirofosfato y sosa contenido en la paja experimentó un leve ascenso al final del proceso de biodegradación (Fig. V.4), debido fundamentalmente al incremento significativo de ácidos

húmicos (Fig. V.5). Sin embargo, en el alperujo se observó un descenso muy acusado (60,1 %) durante los tres primeros meses del proceso de biodegradación con *P. ostreatus*.

El descenso del carbono extraíble en el alperujo correspondió a un descenso tanto en los niveles de ácidos húmicos (Fig. V.5) como de los ácidos fúlvicos (obtenidos por diferencia entre las dos fracciones anteriores). La solución de pirofosfato y sosa utilizada para extraer las sustancias húmicas del alperujo extrae además moléculas de carbono de elevado peso molecular que se determinan como ácidos húmicos sin serlo (Boyd y col., 1980). Por ello, en los procesos de degradación de la materia orgánica contenida en estos tipos de residuos predominan los procesos de mineralización sobre los de humificación (García y col., 1991; García-Gómez y col., 2005; Benítez y col., 2000a, 2005), detectándose valores menores al final de los mismos.

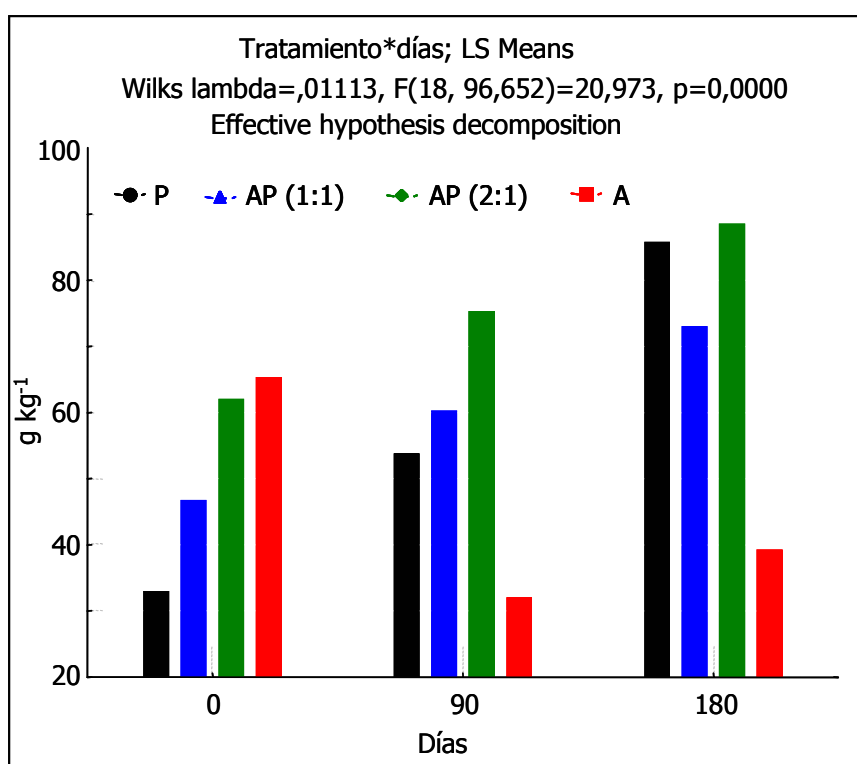


Figura V.5. Evolución de los ácidos húmicos durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 5)

Sin embargo, la acción de las hifas de *Pleurotus* provocó, en la paja o en las mezclas de paja y alperujo, un inicio de degradación de la materia orgánica, creando las condiciones necesarias para que los procesos de humificación aparezcan tras los de mineralización (Fig. V.5). Por el contrario estos ácidos húmicos se incrementaron al final del proceso de compostaje en los sustratos P, AP (1:1) y AP (2:1) ensayados. Esto se puede explicar debido a que, como se ha descrito, se aplicó yeso (1-2%) en la preparación de los sustratos, lo cual produce una marcada despolimerización de los compuestos orgánicos no hidrolizables (Vizcayno y García-González, 2000). La pérdida de carbono orgánico que se observa cuando se adiciona yeso está de acuerdo con los resultados de Belkacem y Nys (1995), que lo

atribuyen a la competencia entre el carbono orgánico disuelto y los aniones SO_4^{2-} por las posiciones de cambio positivamente cargadas.

V.2.5. RELACIÓN CARBONO-NITRÓGENO (C/N)

La relación C/N es uno de los factores principales que condicionan los procesos de estabilización de la materia orgánica. Teóricamente, una relación C/N de 25-35 es una proporción equilibrada para que la actividad microbiana se desarrolle de forma óptima (Trautmann y Olinciw, 1996), ya que si la relación está por debajo de este valor se pueden producir pérdidas por volatilización de nitrógeno, mientras que si es superior a 30 la actividad biológica se reduce de forma considerable.

Tabla V.1. Relación C/N al inicio y final del proceso de biodegradación con *P.ostreatus*.

	Inicial	Final
P	309	146
AP (1:1)	85	36
AP (2:1)	68	26
A	47	29

Tanto el alperujo como, especialmente la paja y, por consiguiente, las mezclas ensayadas, mostraron una relación C/N muy elevada (Tabla V.1), y por tanto, no equilibrada para la degradación de dichos materiales por parte de los microorganismos. Sin embargo, los resultados mostraron que la actividad del hongo *P. ostreatus* no estuvo condicionada por un determinado equilibrio entre los niveles de C y de N, por lo que actuó sobre materiales ricos en celulosa y lignina degradando los compuestos carbonados contenido en ellos. Dicha degradación provocó un descenso en la relación C/N en todos los tratamientos ensayados (entre un 60 y un 46 %), llegando, en los sustratos que contenían alperujo, a niveles considerados óptimos (~ 30) para la degradación de la materia orgánica, todavía por estabilizar, mediante otros procesos de degradación tales como compostaje y vermicompostaje.

V.2.6. POLIFENOLES Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS

Los polifenoles son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal; principalmente en la forma de bioproductos generados en el metabolismo de las plantas. Se dividen principalmente en tres grandes grupos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos), flavonoides (antocianidinas, flavonoles, flavononas, flavonas, isoflavonas y chalconas) y taninos (taninos hidrolizables y taninos condensados) (Escarpa y González, 2001). Como se comentó ampliamente en el capítulo II, la recalcitrancia que presenta el alperujo a la degradación está estrechamente ligada a los elevados

contenidos de polifenoles que presentan (Aggelis y col. 2002; Lessage-Maesens y col. 2001). Además, son los responsables su alta toxicidad y actividad antimicrobiana (Perez y col., 1992; Casa y col., 2003).

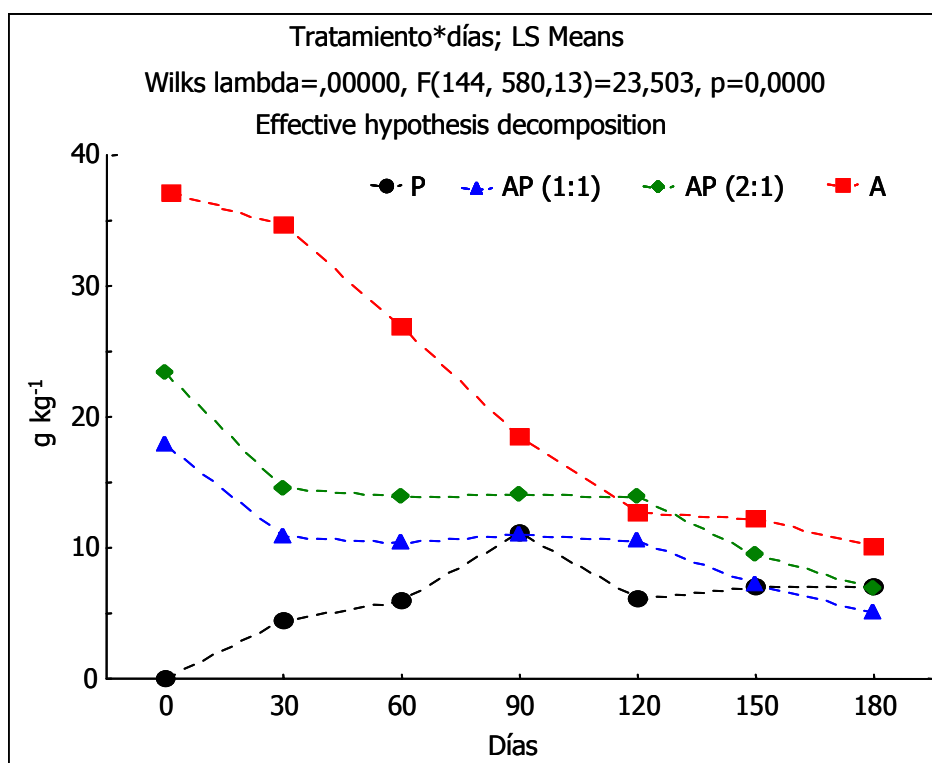


Figura V.6. Evolución del contenido de polifenoles extraíbles totales durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 6)

El descenso significativo detectado en los niveles de polifenoles desde el inicio del proceso de biodegradación del alperujo (Fig. V.6) ha sido normalmente atribuido a la actividad de la enzima lacasa de *P. ostreatus* (Saavedra y col., 2005). Sin embargo, observando la actividad de esta enzima (Fig. V.7 y 8), cabría pensar que la degradación de los polifenoles es un proceso oxidativo que involucraría a más enzimas, bien asociadas al metabolismo del hongo o de microorganismos capaces de colonizar el sustrato, ya que la disminución ocurrió desde los primeros estadios del proceso.

No se observó una diferencia significativa de la actividad lacasa entre los tratamientos A, AP (2:1) y AP (1:1). En ninguno de los cuatro sustratos ensayados se detectó actividad lacasa hasta después del segundo mes del proceso de biodegradación, indicando un período inicial de colonización del hongo. Posteriormente, la actividad aumentó de forma significativa hasta los 150 días en los tratamientos que incorporaron paja y hasta los 120 días en el alperujo sin mezclar.

Por el contrario, la degradación de la paja por parte de *P. ostreatus* incrementó de forma significativa los niveles de polifenoles (Fig. V.6). La habilidad de los basidiomicetos para degradar o modificar la lignina mediante la enzima lignina peroxidasa ha sido demostrada (Martínez y col., 2005) y, como consecuencia, la liberación de fenoles al medio. En este sentido, existe una relación inversa

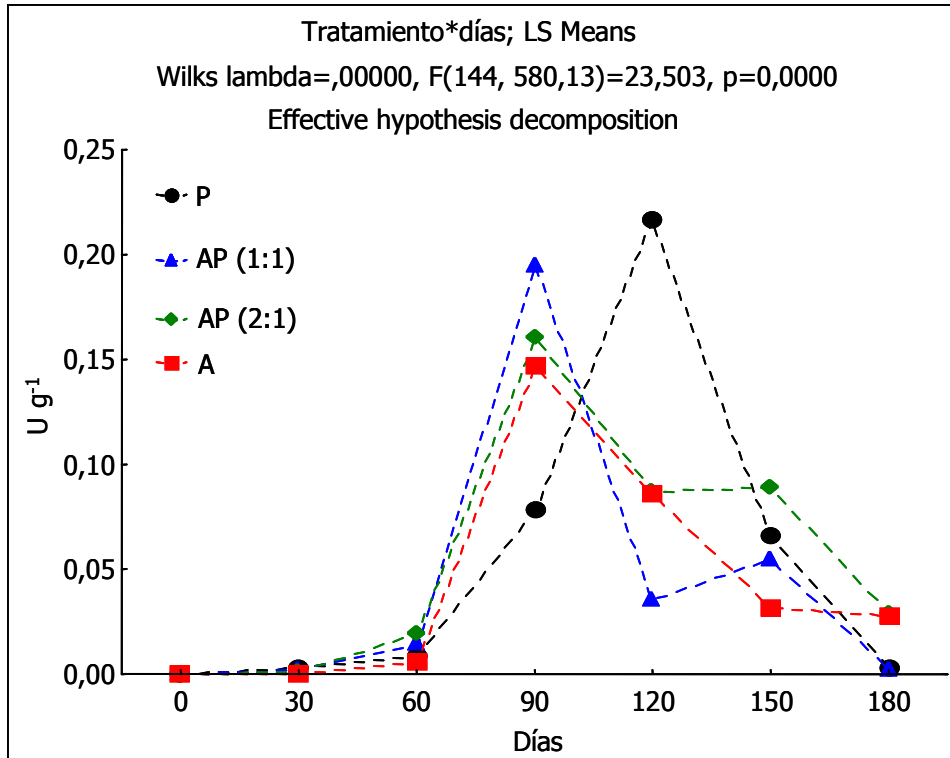


Figura V.7. Evolución de la actividad lacasa-siringaldazina durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 7)

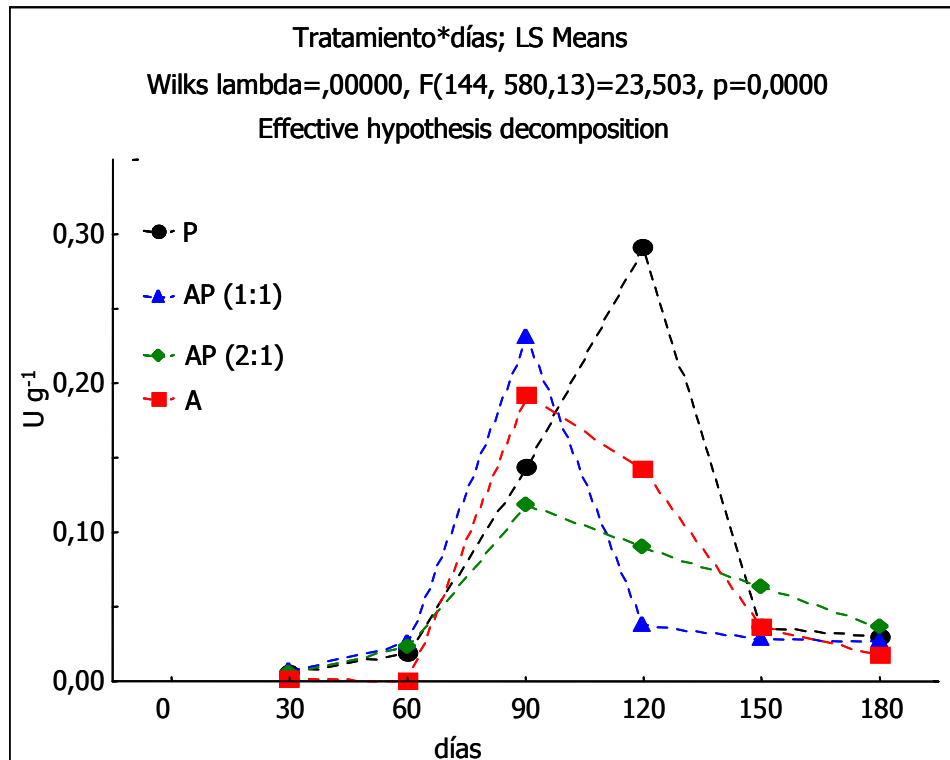


Figura V.8. Evolución de la actividad lacasa-ABTS durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 8).

entre polifenoles y niveles de lignina en la paja, aumentando significativamente los primeros (Fig. V.6) conforme disminuyó la segunda (Tabla V. 2).

V.2.7. HEMICELULOSA, CELULOSA Y LIGNINA

La actividad de *P. ostreatus* sobre la degradación de hemicelulosa, celulosa y lignina queda reflejada en la tabla V.2. En ella queda patente que la batería de exoenzimas del hongo, fundamentalmente fenoloxidasas, celulasas y ligninoperoxidasas (Ericsson y col., 1990), fue capaz de degradar dichos compuestos presentes tanto en el alperujo como en la paja y en la mezclas de ambos.

Tabla V.2. Hemicelulosa, celulosa y lignina al inicio (I) y final (F) del proceso de biodegradación con *P. ostreatus*. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 9)

	HEMICELULOSA g kg ⁻¹		CELULOSA g kg ⁻¹		LIGNINA g kg ⁻¹	
	I	F	I	F	I	F
P	300	175	379	281	59	45
AP (1:1)	204	153	254	191	140	113
AP (2:1)	176	149	222	1285	167	127
A	108	90	128	101	222	207

V.2.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

V.2.8.1. ACTIVIDAD DESHIDROGENASA

La deshidrogenasa es una enzima intracelular, por lo que ha sido considerado como un parámetro indicador del estado metabólico de los microorganismos del suelo (García y col., 1999). Su actividad representa la transferencia de energía en la cadena respiratoria y el rango total de las actividades oxidativas (Quilchano y Marañón, 2002). Esta enzima se encuentra dentro de células vivas, y ha sido utilizada también como indicador de la actividad biológica de en materiales orgánicos sometidos a procesos de bioestabilización tales como compostaje y vermicompostaje (García y col., 1993; Benítez y col., 1999, 2002).

La actividad de todos los sustratos ensayados fue baja (Fig. V.9), ya que en su composición abundan los compuestos de naturaleza lignocelulósica y recalcitrante de escasa degradabilidad, además de presentar un escaso contenido en nutrientes, una materia orgánica escasamente humificada y, en el caso del alperujo, elevada presencia de sustancias tóxicas para plantas y organismos como son los compuestos fenólicos (Fig. V.6).

La biodegradación mediada por *P. ostreatus* no aumentó de forma significativa los valores de actividad deshidrogenasa en el alperujo, lo que indica el escaso estímulo que ejerció sobre la actividad de los microorganismos. La disminución paulatina del carbono fácilmente disponible (Fig. V. 3) estaría directamente relacionado con la baja actividad microbiana detectada a lo largo del proceso. Por el contrario, el aumento temporal detectado en la paja reflejó el efecto del hongo sobre la degradación de este sustrato, fundamentalmente constituido por compuestos, difíciles de degradar, menos recalcitrantes como celulosas y hemicelulosas (Tabla V.3), y la consecuente liberación de compuestos de menor peso molecular y por tanto más fácilmente asimilables, fenómenos directamente relacionados con el incremento de actividad deshidrogenasa (Benítez y col., 1999).

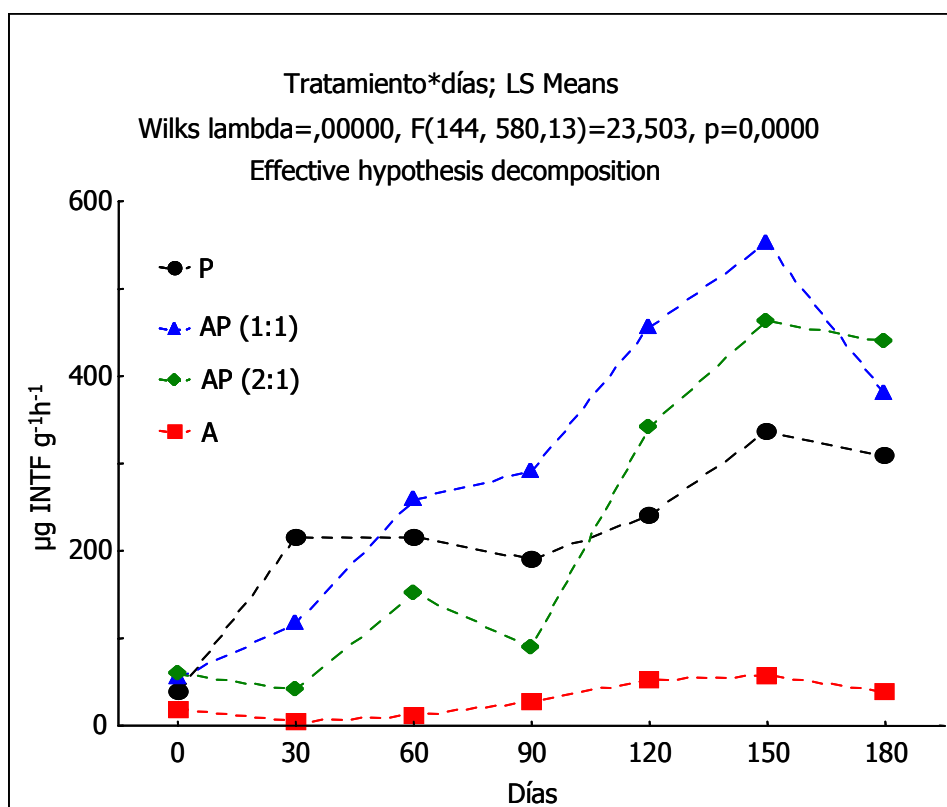


Figura V.9. Evolución de la actividad deshidrogenasa durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 10)

La composición de la paja condicionó asimismo la dinámica de las mezclas, detectándose un aumento significativo de la actividad deshidrogenasa a partir del primer mes en la mezcla 1:1 y a partir del tercero en la mezcla que contenía mayor proporción de alperujo. En ambos casos, los productos finales mostraron una actividad microbiana mayor que los sustratos iniciales – en AP (1:1) se incremento en 577% y AP (2:1) lo hizo en 644%. Teniendo en cuenta que la actividad deshidrogenasa ha sido considerada como índice de la fertilidad de suelos (Trasar y col., 1998; Alef, 1995), los valores finales detectados en las mezclas alperujo y paja permitirían, *a priori*, caracterizar los mismos como posibles enmendantes de suelos degradados con baja actividad biológica.

V.2.8.2. ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA

La β -glucosidasa es parte del complejo enzimático que actúa en forma sinérgica en la degradación de la celulosa (Enari y Niku-Paavola,1987), hidrolizando celobiosa con formación de glucosa (Muller,1988).

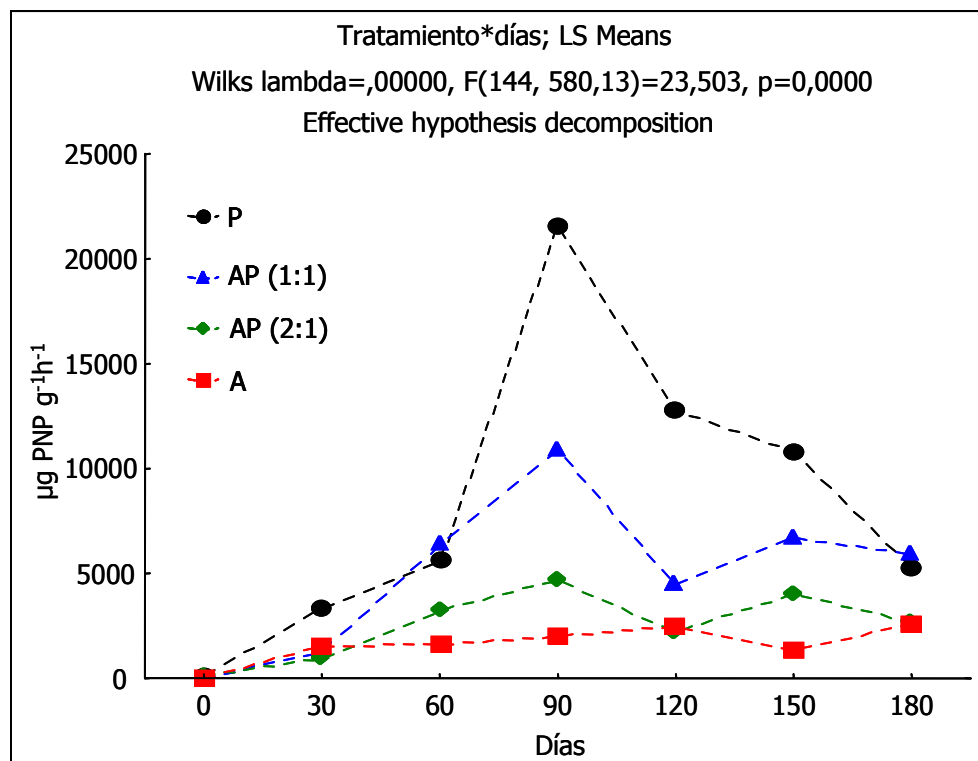


Figura V.10. Evolución de la actividad β -glucosidasa durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 11)

Al ser un enzima hidrolítico, y por tanto, inducible por el sustrato, los valores iniciales muestran la escasa cantidad de sustratos carbonados tipo celobiosa presentes en los materiales originales (Fig. V.10). La acción del hongo *P. ostreatus* sobre la paja o mezclas de paja y alperujo promovió la hidrólisis de las moléculas de C de mayor peso molecular, celulosa y hemicelulosa, y, por tanto, la inducción del enzima. La mayor recalcitrancia a la degradación de las moléculas de C presentes en el alperujo no favoreció la liberación al medio de celobiosa y consecuentemente la síntesis de enzima, por lo que el aumento detectado no fue estadísticamente significativo.

V.2.8.3. ACTIVIDAD FOSFATASA

Las fosfatasas participan en el ciclo del P del suelo catalizando la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido ortofosfórico a formas de P asimilables para las plantas (Eivazi y Tabatabai, 1977). La fosfatasa es una hidrolasa que actúa en la hidrólisis de esteres fosfóricos, liberando fosfato inorgánico que puede ser

asimilado por los microorganismos y las plantas (Alef y col. 1995). Las más estudiadas son las fosfomonoestearasas que se clasifican en ácidas y alcalinas de acuerdo al pH óptimo para su actividad (Dick y Tabatabai, 1984). Estas enzimas constituyen un índice de la potencialidad de un suelo para mineralizar el P orgánico y también estimar la actividad biológica de los suelos (Maire y col., 1999).

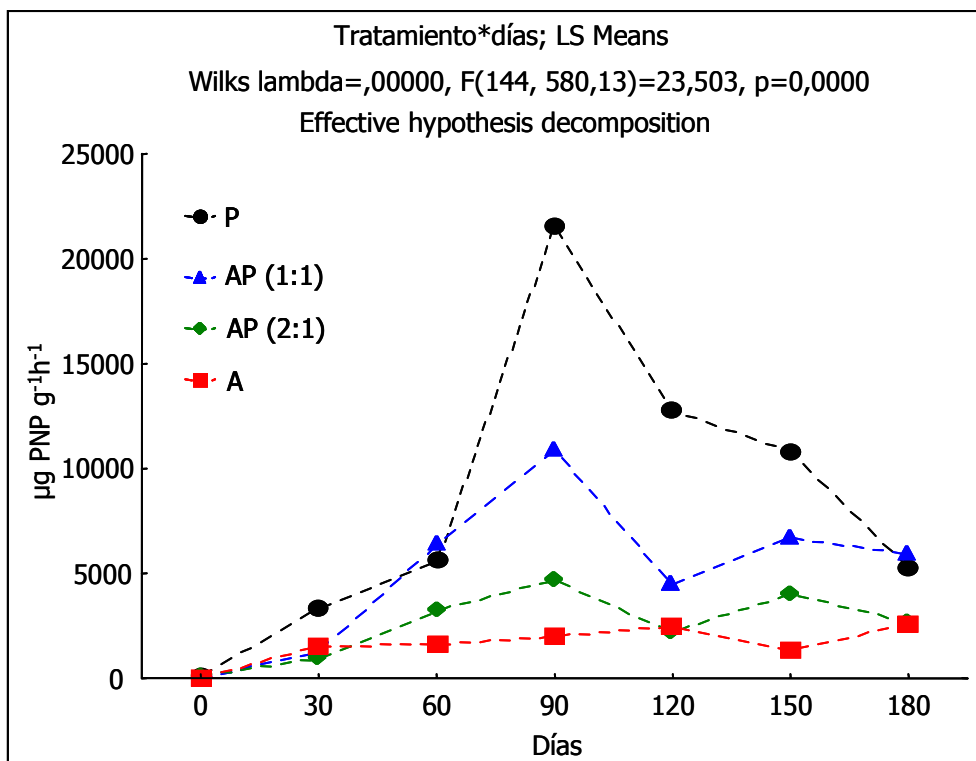


Figura V.11. Evolución de la actividad fosfatasa durante el proceso de biodegradación del alperujo, paja y mezclas. Valores medios de cuatro repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 12)

En la figura V.11 se observa que la actividad fosfatasa en el sustrato alperujo presentó un incremento exponencial de un 500% durante los primeros 30 días. El que la fosfatasa sea una enzima inducible indica la presencia en el alperujo de una elevada concentración de fosfato orgánico capaz de inducir la síntesis de la enzima, así como la ausencia de suficiente fósforo inorgánico en el medio capaz de inhibir la síntesis de fosfatasa (Nannipieri y col., 1979). A medida que *P.ostreatus* comenzó a degradar el alperujo, la actividad fosfatasa disminuyó en forma constante y significativa hasta el final del experimento.

Tanto los niveles iniciales como finales de actividad fosfatasa fueron significativamente iguales en los tratamientos P y AP (1:1), lo que indicaría que el ciclo del fósforo durante el proceso de biodegradación con hongos estaría directamente relacionado con las características del alperujo utilizado, y poco influido por las enmiendas con paja. De esta manera, aunque en el tratamiento AP (2:1) también se detectaron valores similares al inicio y al final de proceso, la variación temporal sí fue estadísticamente significativa.

V.2.9. MACRONUTRIENTES

Los productos finales obtenidos durante el proceso de degradación con *P.ostreatus*, en general presentan concentraciones significativamente más altas que los sustratos iniciales.

Tabla V.3. Concentración de macronutrientes y sodio al inicio (I) y final del proceso de biodegradación con *P. ostreatus* (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 13)

		P	AP (1:1)	AP (2:1)	A
N g kg⁻¹	I	1,9	6,4	7,9	11
	F	3,2	10	14	14
P g kg⁻¹	I	0,5	3,5	4,5	6,5
	F	1,5	1,7	1,3	10,5
K g kg⁻¹	I	11	12	12	13
	F	33	17	16	21
Ca g kg⁻¹	I	3,6	8,9	11	14
	F	12	24	10	40
Mg g kg⁻¹	I	0,3	2,0	2,6	3,7
	F	1,6	1,6	2,2	5,4
Na mg kg⁻¹	I	106	428	535	750
	F	622	267	157	1297

En relación al nitrógeno, los niveles de este nutriente aumentaron durante el proceso en todos los sustratos (Tabla V.3). La dinámica del nitrógeno durante el proceso de degradación de los distintos sustratos, que corresponden a materiales orgánicos de cadena compleja donde no existe un proceso de lixiviación aparente y tampoco existe formación de amonio debido a que el hongo basidiomiceto se desenvuelve en un ambiente mas bien ácido, es de esperar que las sustancias nitrogenadas tiendan a acumularse y a lo más tenderán a incorporarse en el proceso metabólico del hongo, para terminar siendo parte del micelio que se desarrolla.

En la tabla V.3 se observa asimismo un aumento significativo de la cantidad de fósforo total en los productos finales a base de paja y alperujo sin mezclar. En cambio, en las mejas se registraron descensos significativos. El aumento de fósforo inorgánico podría estar relacionado con el descenso de la actividad fosfatasa registrado durante el proceso de degradación. Tanto el potasio como el calcio presentaron concentraciones significativamente mayores en los productos finales que las determinadas inicialmente. En cambio, en el magnesio no se apreciaron diferencias significativas entre los productos finales e iniciales en los diferentes sustratos ensayados. Por último, la concentración de sodio experimentó, de

forma similar a lo observado a nivel de fósforo, aumentos o descensos dependiendo del tipo de sustrato biodegradado.

V.2.10. MICRONUTRIENTES

Las concentraciones de Fe, Mn, Cu y Zn aumentaron significativamente al final del proceso de biodegradación en el tratamiento constituidos exclusivamente por paja (P) y alperujo (A) (Tabla V.5). En los tratamientos que contenían como sustrato AP (1:1) y AP (2:1), se observó una disminución en los valores de los micronutrientes, aunque en algún caso, se apreció un aumento de la concentración de Mn en AP(1:1) y Fe en AP(2:1). Las disminuciones de la mayoría de los micronutrientes en los diferentes sustratos serían causadas, al igual que lo indicado para los macronutrientes a pérdidas por incorporación en las estructuras fúngicas producidas durante el desarrollo del micelio y cuerpos fructíferos del hongo, ya que no se generaron durante la experimentación aguas de lixiviación.

Tabla V.4. Concentración de micronutrientes al inicio (I) y final del proceso de biodegradación con *P. ostreatus* (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo. Tabla 14)

		P	AP (1:1)	AP (2:1)	A
Fe mg kg⁻¹	I	98	782	1010	1467
	F	219	713	1159	2355
Mn mg kg⁻¹	I	15	23	25	30
	F	68	27	23	57
Cu mg kg⁻¹	I	< 0,2	9,5	13	19
	F	8	7,3	9,3	34
Zn mg kg⁻¹	I	< 0,2	11	14	21
	F	13	9,2	8	44

V.2.11. FITOTOXICIDAD DE LOS SUBSTRATOS INICIALES Y PRPDUCTOS FINALES OBTENIDOS EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE ALPERUJO Y MEZCLAS CON *Pleurotus ostreatus*.

El análisis de fitotoxicidad realizados al alperujo, paja, alperujo-paja (1:1) y alperujo-paja (2:1) permitió comprobar, que los sustratos que contenían alperujo inhibieron de forma drástica la germinación de *Lepidium sativum* (Fig. V.12). Esto esta motivado, como se comentó ampliamente en el capítulo II, por la presencia en este subproducto de fenoles, lípidos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular que presentan un marcado carácter inhibitor de la germinación (Moreno y col., 2000; Saviozzi y col., 1993).

La acción de *P. ostreatus* sobre el alperujo provocó una disminución de tales sustancias fitotóxicas y, consecuentemente, un aumento del índice de germinación en los tres tratamientos que incorporaron este sustrato orgánico.

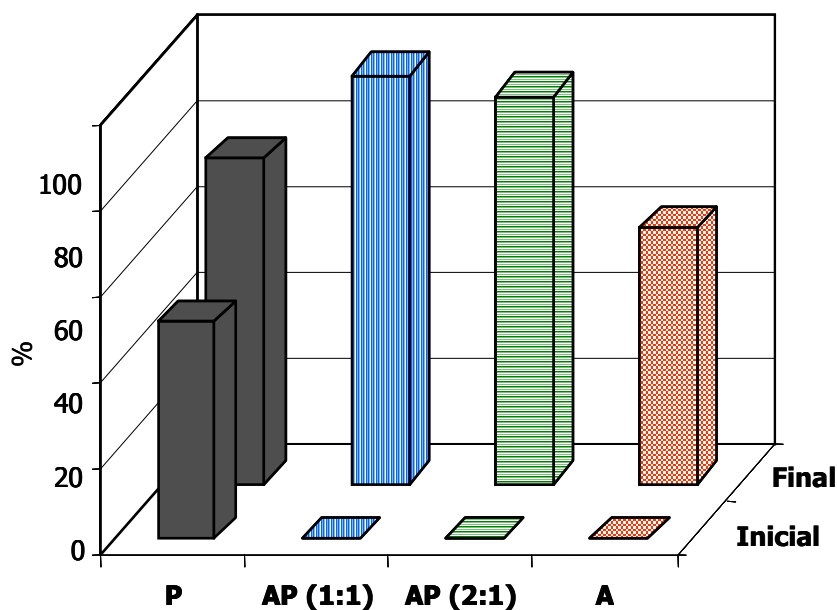


Figura V.12. Índice de germinación de *Lepidium sativum*, L. en extractos acuosos de los sustratos iniciales (I) y productos finales (F). Valores medios de cinco repeticiones.

Los valores obtenidos en el alperujo sin mezclar, a diferencia de lo observado en el capítulo II, alcanzaron los niveles propuestos por Zucconi y col. (1981a) y que caracterizan la ausencia de fitotoxicidad. En aquel caso, el alperujo tratado mostró un índice de germinación inferior al 40%, indicando que no todos los compuestos fitotóxicos fueron degradados por la acción de *P.ostreatus* durante un periodo de cuatro meses. Los resultados obtenidos en el presente experimento muestran que un periodo adicional de dos meses fue suficiente para alcanzar en el alperujo niveles indicativos de carencia de fitotoxicidad.

El proceso de degradación con *P.ostreatus* fue mucho más eficiente en las mezclas de alperujo-paja, alcanzándose índices de germinación de 95 y 90 por ciento respectivamente, por lo cual se puede aseverar que las sustancias inhibitoras de la germinación prácticamente fueron eliminadas de los sustratos.

VI. ESTUDIO DE LAS POSIBILIDADES DE UTILIZACIÓN DEL ALPERUJO Y SUS PRODUCTOS DE BIODEGRADACION MEDIANTE HONGOS O/Y LOMBRICES COMO ENMIENDAS ORGÁNICAS DEL SUELO



VI. Utilización de alperujos, natural o biodegradados como enmiendas orgánicas del suelo

VI.1. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1.1. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DEL SUELO

Se utilizó la capa arable (0-20 cm) de un suelo localizado en las cercanías de Fuentevaqueros (Granada) (Figura VI.1). El análisis químico y textural de la capa arable del suelo utilizado en el experimento se expone en la tabla VI.1.

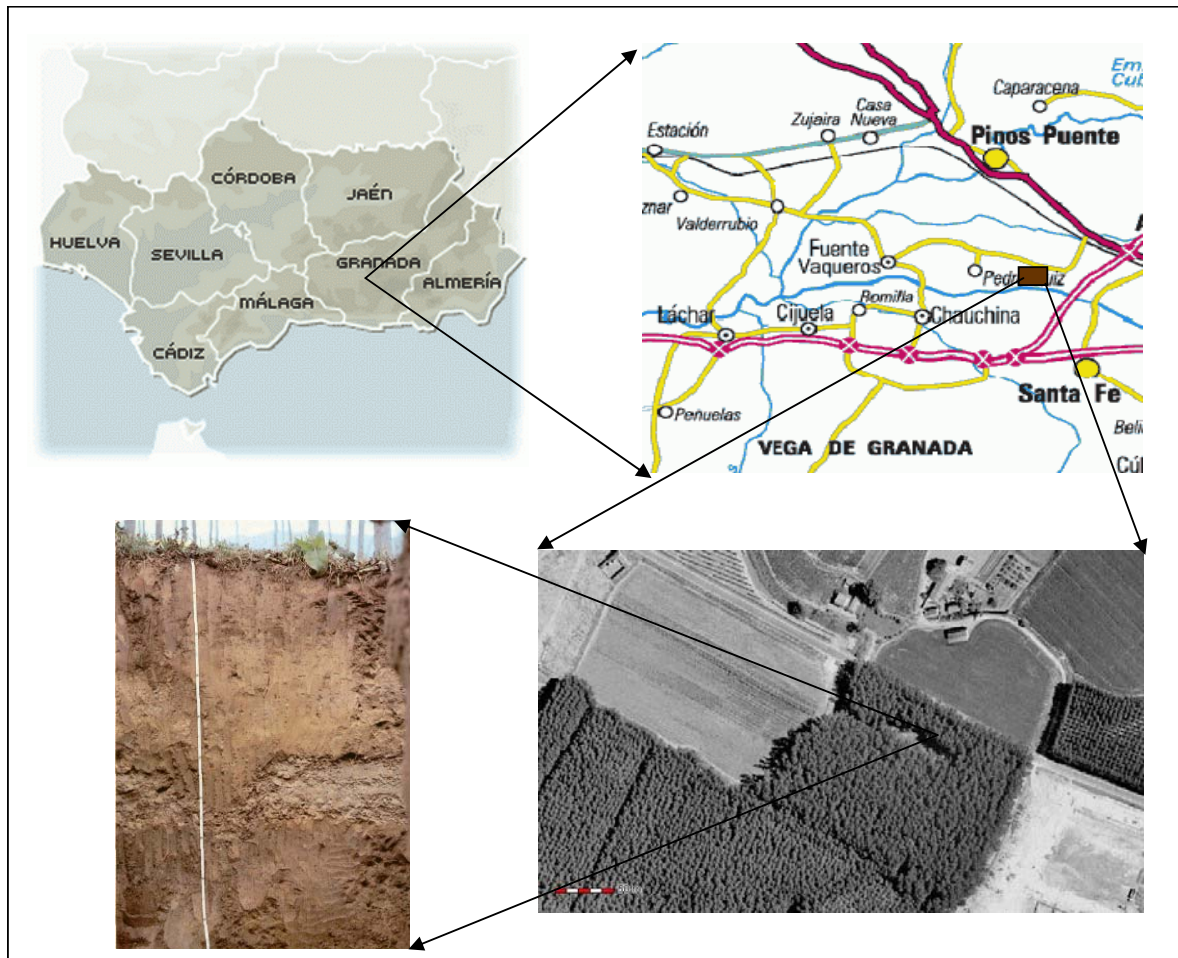


Figura VI.1. Localización y perfil del suelo utilizado en el experimento

Tabla VI.1. Características de la capa arable del suelo utilizado en el experimento de invernadero

Arena g kg⁻¹	Limo g kg⁻¹	Arcilla g kg⁻¹	pH	CE dS m⁻¹	Carbonatos g kg⁻¹
354	517	129	8.4	0.25	2229
CIC cmol(+) kg⁻¹	COT g kg⁻¹	NKT g kg⁻¹	C/N	AB-DTPA-P mg kg⁻¹	AB-DTPA-K mg kg⁻¹
8.8	8.9	0.9	10	4	27

VI. Utilización de alperujos, natural o biodegradados como enmiendas orgánicas del suelo

La descripción del perfil del suelo se expone a continuación:

Clasificación: Fluvisol calcárico (FAO, 1998), Xerofluvent Aquico (Soil Survey Staff, 1998)

Ubicación: Vega de Granada, a 2 Km al sur del pueblo de Fuentevaqueros (Granada)

Coordenadas: X: 434,22 Y: 4119, 85

Altitud: 548 m

Forma del terreno circundante: Llano

Pendiente: Llano

Vegetación o uso actual: Cultivo de chopos.

Material original: Aluvial indiferenciado (Holoceno)

Drenaje: Bien drenado.

Condiciones de humedad: Seco en todo el perfil.

Pedregosidad: Nula

Afloramientos rocosos: Nulos

Erosión: Nula

Horizonte AP (0-20 cm) "capa arable":

Color gris pardo claro (2.5Y6/2) en seco y pardo grisáceo (2.5Y5/2), en húmedo; franco-limoso; estructura granular, gruesa, fuerte; ligeramente plástico en mojado; muy friable en húmedo; muy abundantes poros; calcáreo; abundantes raíces; límite difuso.

Horizonte AC (20-50 cm)

Color gris claro (2.5Y7/2), en seco; pardo grisáceo (2.5Y5/2), en húmedo; franco; estructura masiva; ligeramente plástico en mojado; muy friable en húmedo; calcáreo; bastantes raíces; límite gradual y ondulado.

Horizonte C1 (50-70 cm)

Color gris claro (2.5Y7/2), en seco; pardo grisáceo (2.5Y5/2), en húmedo; arenoso-franco; estructura masiva; no plástico en mojado; muy friable en húmedo; suelto en seco; calcáreo, frecuentes poros tubulares, bastantes raíces; límite neto y ondulado.

Horizonte C2 (70-95cm)

Color gris claro (2.5Y7/2), en seco; pardo grisáceo (2.5Y5/2), en húmedo; limoso; estructura masiva; ligeramente plástico en mojado; muy friable en húmedo; calcáreo, bastantes poros tubulares bastantes raíces; límite inferior brusco abrupto.

Horizonte C3 (95-120cm)

Capa de gravas con matriz arenosa gruesa; Estructura de grano suelo; calcáreo, abundantes poros intersticiales, frecuentes raíces; límite neto y ondulado.

Horizonte C3G (+120 cm)

Gravas con características semejantes al horizonte anterior pero infiltradas con frecuentes nódulos ferruginosos; reacción fuerte.

VI.1.2. ENMIENDAS ORGANICAS OLÉICOLAS**Tabla VI.2.** Análisis físico-químico y biológico de las enmiendas orgánicas oleícolas

	A	AP	AE	APE
pH	5,8	6,8	8,6	8,1
CE dS m⁻¹	7,2	7,6	3,3	1,8
Materia orgánica	942	748	654	470
COT g kg⁻¹	520	408	348	250
CH g kg⁻¹	148	76	12	25
CET g kg⁻¹	165	115	42	54
AH g kg⁻¹	98	57	19	18
NKT g kg⁻¹	8,1	13,9	14,6	20,8
C/N	64	29	23	12
Polifenoles g kg⁻¹	43	2,6	1,6	0
Deshidrogenasa µgINTF g⁻¹h⁻¹	9	41	248	117
β-Glucosidasa □gPNP g⁻¹h⁻¹	19	255	113	428
Fosfatasa □gPNP g⁻¹h⁻¹	245	163	96	138
Ureasa µgNH₄ g⁻¹h⁻¹	20	737	393	2129
IG %	0	41	79	98

Se utilizaron las siguientes enmiendas orgánicas oleícolas cuyo análisis se expone en las tablas VI.2 y VI.3:

A: Alperujo procedente de la extracción del aceite de oliva mediante proceso de centrifugación por dos fases suministrado por la empresa ROMEROLIVA, Deifontes, Granada. Este alperujo fue el mismo residuo inicial en los capítulos II y III de la presente memoria de Tesis Doctoral

AP: Alperujo biodegradado por *Pleurotus ostreatus* (producto final obtenido en el capítulo II de la presente memoria de Tesis Doctoral).

AE: Alperujo biodegradado por *Eisenia foetida* o vermicompost de alperujo (producto final obtenido en el capítulo III de la presente memoria de Tesis Doctoral).

APE: Alperujo biodegradado por *Pleurotus ostreatus* *Eisenia foetida* o vermicompost de alperujo predegradado por *P. ostreatus* (producto final obtenido en el capítulo IV de la presente memoria de Tesis Doctoral).

Tabla VI.3. Concentración de macronutrientes, sodio, micronutrientes y metales pesados en las enmiendas orgánicas oleícolas.

	A	AP	AE	APE
P₂O₅ g kg⁻¹	1,8	25	5	18
K₂O g kg⁻¹	13	25,2	11	6,8
CaO g kg⁻¹	6,3	38	30	48
MgO g kg⁻¹	2	7	9	7
Na mg kg⁻¹	750	890	417	436
Fe mg kg⁻¹	419	1820	2457	2215
Mn mg kg⁻¹	12	43	60	49
Cu mg kg⁻¹	9	22	22	29
Zn mg kg⁻¹	10	33	56	38

VI.1.3. TRATAMIENTOS Y SERIES REALIZADAS

Se prepararon cinco tratamientos constituidos por el suelo seleccionado y el suelo enmendado con las cuatro enmiendas oleícolas:

S: Suelo natural tamizado por 8 mm.

SA: Suelo tamizado por 8 mm y mezclado con alperujo natural adicionado a una dosis equivalente a 40 Mg ha⁻¹.

SAP: Suelo tamizado por 8 mm y mezclado con alperujo biodegradado por *Pleurotus ostreatus* adicionado a una dosis equivalente a 40 Mg ha⁻¹.

SAE: Suelo tamizado por 8 mm y mezclado con alperujo biodegradado por *Eisenia foetida* que fue adicionado a una dosis equivalente a 40 Mg ha⁻¹.

SAPE: Suelo tamizado por 8 mm y mezclado con alperujo *biodegradado por Pleurotus ostreatus* y *Eisenia foetida* adicionado a una dosis equivalente a 40 Mg ha⁻¹.

Además de ello se realizaron 3 series de tratamientos:

NF (no fertilización): Serie constituida por los cinco tratamientos anteriores y sin fertilización adicional

FQ (fertilización química): Serie constituida por los cinco tratamientos anteriores, cuyos suelos fueron suplementados con NPK en la dosis recomendada para el cultivo ensayado, simulando un sistema agrícola convencional

FB (fertilización biológica): Serie constituida por los cinco tratamientos anteriores, que fueron inoculados con cepas de rizobio y micorrizas, simulando un sistema agrícola biológico.

VI.1.4. EXPERIMENTO DE INVERNADERO

VI.1.4.1. PREPARACIÓN DE LAS MACETAS

En función del número de tratamientos (5), series (3) y repeticiones (3), hubo que preparar un total de 45 macetas. Se utilizaron macetas troncocónicas de PVC de 1 litro de capacidad, que tenían un drenaje para recoger las pérdidas de agua por percolación. La preparación de cada maceta correspondiente a cada serie fue la siguiente (Figura VI.2):

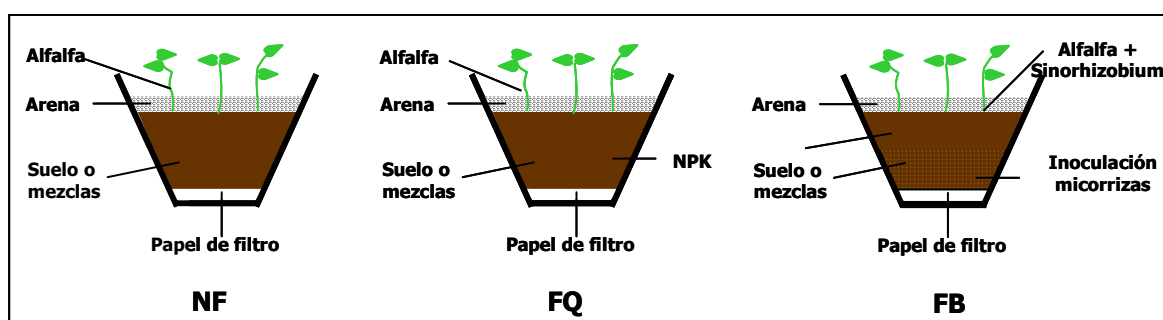


Figura VI.2. Preparación de las macetas de cada serie realizada

NF: En el fondo de cada maceta se colocó un disco de papel filtro para evitar pérdidas y sobre éste 500 g de suelo tamizado (< 8 mm) con su correspondiente enmienda oleícola homogéneamente distribuida. Sobre el suelo, humedecido con 80 ml de agua, se depositó una capa de 2 cm (30 g) de arena sílicea.

FQ: Una vez colocado los 500 g de suelo, sólo o enmendado, sobre el papel de filtro de cada maceta, éste suelo fue suplementado con nitrógeno (20 kg ha^{-1}), fósforo ($200 \text{ kg de P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$) y potasio ($300 \text{ kg de K}_2\text{O Ha}^{-1}$). La aplicación de esos fertilizantes se realizó de forma conjunta disuelta en 80 ml de agua. Una vez humedecido el suelo con esa solución se depositó sobre él una capa de 2 cm (30 g) de arena sílicea.

FB: Sobre el papel de filtro de cada maceta se colocó 250 g de suelo, solo o enmendado orgánicamente. Este suelo fue suplementado con 15 g de inóculo de micorrizas (*Glomus mosseae*). Posteriormente se añadió 250 g de suelo, solo o enmendado. Una vez humedecido el suelo con esa solución se depositó sobre él una capa de 2 cm (30 g) de arena sílicea.

VI.1.4.2. SIEMBRA Y CULTIVO

Se utilizó como cultivo indicador alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Aragón). La siembra se realizó a razón de 8 plántulas por maceta. En la serie FB, las semillas pregerminadas de alfalfa habían sido inoculadas previamente con su microsimbionte *Sinorhizobium melliloti* GR4 (Mercado y Olivares, 1993). El cultivo bacteriano se realizó en medio líquido TY (Beringer, 1974) y en agitación a 28°C hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0.6. Se tomó 1 ml de cultivo (aprox. 10^6 células) con objeto de inocular cada una de las semillas pregerminadas de alfalfa.

Todas las macetas, colocadas sobre platos de plástico, fueron ubicadas en un invernadero en condiciones controladas de temperatura y luminosidad. A los 10 días de su ubicación, las plántulas de alfalfa fueron raleadas, dejando cuatro plantas por maceta. Todas las macetas, fueron regadas periódicamente con idénticas cantidades de agua con objeto de que la humedad del suelo correspondiese a su capacidad de campo. Si accidentalmente las macetas percolaron, los líquidos de drenaje fueron vertidos en el siguiente riego.

VI.1.4.3. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

A los 80 días del inicio del experimento, y una vez que en la mayoría de las macetas, había empezado la floración del cultivo, se llevó a cabo la recolección del material vegetal. Para ello se utilizaron tijeras de acero inoxidable, realizándose el corte a 1 cm del suelo. La parte aérea del cultivo de alfalfa de cada maceta fue secada en estufa de aire forzado a 65°C durante 24 horas. Posteriormente fueron secadas, pesadas y molidas hasta la obtención de un polvo fino y homogéneo. El material vegetal fue conservado herméticamente en bolsas de plástico hasta su posterior análisis.

Las raíces fueron extraídas del suelo de cada maceta, primero mediante fuerte agitación y posteriormente el suelo que permanecía todavía unido a las raíces fue separado mediante una mayor agitación. El sistema radicular fue lavado con agua hasta que estuvieron completamente limpias. Estas raíces fueron utilizadas para el recuento visual de nódulos y para la determinación de la frecuencia y porcentaje de micorrización. Una vez realizado el conteo, las raíces fueron secadas a 65 °C durante 24 h y finalmente pesadas.

El suelo total de cada maceta, incluyendo aquel adherido a las raíces, fue separado en dos fracciones. La primera fracción fue secada al aire y tamizada (< 2mm) siendo conservada en bolsas de plástico hasta su posterior análisis químico. La segunda fracción, fue guardada herméticamente a 4° C hasta la realización de los análisis enzimáticos.

VI.1.5. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA PLANTA

VI.1.5.1. MINERALIZACIÓN SULFÚRICA DE LAS MUESTRAS VEGETALES (Wolf, 1982)

VI. Utilización de alperujos, natural o biodegradados como enmiendas orgánicas del suelo

Se pesan 0.25 g, aproximadamente, de muestra vegetal molida y seca. Colocar en Erlenmeyer de 50 mL y añadir 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, procurando mojar bien toda la muestra. Calentar en placa a 110°C hasta que finalice la emisión de vapores de CO₂ (3 h. aproximadamente). Retirar el Erlenmeyer de la placa y dejar enfriar. A continuación, se adiciona agua oxigenada al 30%, exenta de fósforo, poco a poco para evitar proyecciones de la muestra. Una vez que la muestra se torna completamente incolora, se procede a calentar a 150° C durante unos 15 minutos para eliminar los restos de peróxido que pudiesen quedar. Una vez fría la muestra, se enrasa a un volumen de 100 mL.

VI.1.5.2. ANÁLISIS DEL NITRÓGENO TOTAL EN EL MINERALIZADO (Baethgen y Alley, 1989)

A 1 mL de mineralizado, convenientemente diluido, se adicionan 5.5 mL de solución buffer (0.1M fosfato monosódico, 5% tartrato sodio-potasio, 5.4% hidróxido sódico, 4 mL de solución de salicilato sódico 15%-nitroprusiato sódico 0.03% y 2 mL de solución de hipoclorito sódico 5.25%. Pasados 15 minutos, se mide el color formado en un espectrofotómetro Shimadzu Mod. UV a 650 nm.

VI.1.5.3. ANÁLISIS DEL FÓSFORO TOTAL EN EL MINERALIZADO (C.I.I., 1969)

1 mL de mineralizado, 1 mL de reactivo nitrovanadomolibdico y 3 mL de H₂O se mezclan en tubo de ensayo y se agita. Esperar 1 hora. Medir en espectrofotómetro Shimadzu Mod. UV a 430 nm.

VI.1.5.4. ANÁLISIS DEL POTASIO Y SODIO DEL MINERALIZADO (C.I.I., 1969).

El análisis del potasio y sodio en planta se realizó, directamente sobre el mineralizado o previa dilución, mediante fotómetro de llama Corning mod 400.

VI.1.5.5. MINERALIZACIÓN NÍTRICO-PERCLÓRICA DE LAS MUESTRAS VEGETALES (AOAC, 1984)

La mineralización se realizó añadiendo 10 ml de NO₃H-CIO₄H a 1 g de muestra orgánica. La digestión se lleva a cabo en un baño de arena a 200°C hasta que desaparecen los vapores nitrosos y de CIO₄H. Una vez frío, se añaden 10 ml de ClH y se calienta durante 1 hora a 200°C. El mineralizado se llevó a 50 mL.

VI.1.5.6. ANALISIS DE MICRONUTRIENTES DEL MINERALIZADO

Determinación directa del hierro, manganeso, cobre y zinc en el mineralizado mediante espectrofotómetro de absorción atómica GBC 932 plus.

VI.1.5.7. MICORRIZACIÓN

El porcentaje de micorrización de la raíz se estimó mediante observación visual en microscopio óptico de 12 raicillas por planta de 1 cm de longitud seleccionadas al azar, teñidas con 0.05% azul tripan en lactofenol (v/v) según el método descrito por Phillips y Hayman (1970). Los parámetros de colonización por micorrizas se determinaron usando el método descrito por Trouvelot y col., (1986). La frecuencia de colonización (F%) es la razón entre los fragmentos de raíz colonizada entre el número de raíces observadas. Da una estimación de la longitud de raíz colonizada o del número de raíces micorrizadas, mientras que la intensidad de la colonización (M%) es una estimación de la intensidad de córtex radicular micorrizado. Se realizaron cuatro duplicados por tratamiento.

VI.1.6. MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DEL SUELO POSTCOSECHA

En el suelo obtenido después de la recogida del cultivo se realizaron, entre otros los siguientes análisis cuyas metodologías aparecen expuestas en el capítulo II de la memoria de Tesis Doctoral:

- pH, según método II.1.4.1.
- Conductividad Eléctrica, según método II.1.4.2.
- Carbono Orgánico Total, según método II.1.4.3.
- Carbono hidrosoluble, según método II.1.4.4.
- Carbono extraíble total, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, según método II.1.4.5.
- Nitrógeno kjeldahl total, según método II.1.4.8.1.
- Actividad deshidrogenasa, según método II.1.4.7.1., pero utilizando 1 g de suelo
- Actividad β -glucosidasa, según método II.1.4.7.2., pero utilizando 1 g de suelo
- Actividad fosfatasa, según método II.1.4.7.3., pero utilizando 1 g de suelo
- Actividad ureasa, según método II.1.4.7.4., pero utilizando 1 g de suelo.

VI.1.6.1. ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO (Guitan Ojea y Carballas, 1976)

El análisis textural del suelo se realizó, una vez destruida su materia orgánica y dispersada con hexametafosfato sódico, por el método de la pipeta de Robinson.

VI.1.6.2. CARBONATO TOTAL DEL SUELO (M.A.P.A., 1986)

El método se basa en la determinación del CO₂ que se desprende, en un dispositivo cerrado con presión y temperatura constante, cuando una muestra de suelo es tratada con CIH 1:1.

VI.1.6.4 FÓSFORO, POTASIO Y MICRONUTRIENTES ASIMILABLES DEL SUELO (SOLTAMPOUR Y SCHWAB, 1977)

Extracción del P, K, Fe, Mn, Cu y Zn del suelo (relación suelo: extractante 1:2) con CO_3HNNH_4 1M-DTPA 0.005M, pH 7.6 (AB-DTPA). Agitación a 120 ciclos/min durante 2 horas. Filtración. Medida del P por el método del nitrovanadomolibdico (C.I.I., 1969) y del K por fotometría de llama (C.I.I., 1969). Medida de los micronutrientes y metales pesados del filtrado en un espectrofotómetro de absorción atómica GBC 932 plus.

VI.1.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico se realizó con el programa informático STATISCA (Tatsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) siguiendo los modelos factoriales de análisis de la varianza expuestos en el apartado V.1.7, pero considerando como variables independientes categóricas: TRATAMIENTO y TIPO DE FERTILIZACIÓN y variables dependientes: CARACTERÍSTICAS CULTIVO, CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS y BIOQUÍMICAS DEL SUELO.

VI.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.2.1. PARAMETROS FISIOLÓGICOS DEL CULTIVO DE ALFALFA.

En la foto VI.1 se expone el desarrollo del cultivo de alfalfa antes de su recolección. La aplicación de alperujo natural (SA) al suelo sin fertilizar (NF) provocó un descenso significativo del parte aérea del cultivo de alfalfa (Figura VI.3, Anexo-tabla 15). En cambio, la enmienda con los alperujos biotransformados (SAP, SAE y SAPE) favoreció significativamente el aumento de biomasa aérea de alfalfa. Comparativamente, los mayores aumento tuvieron lugar cuando el suelo fue enmendado con el alperujo biodegradado con *E. foetida*, y los menores cuando lo fue con el alperujo biodegradado con *P. ostreatus*.

En el suelo que recibió una fertilización mineral (FQ), la aplicación de alperujo natural disminuyó acusadamente la parte aérea de alfalfa (68%) (Figura VI.3, Anexo-tabla 15). Esos descensos, aunque no significativos, también tuvieron lugar cuando al suelo se adicionó cada uno de los alperujos biotransformados.

La respuesta del cultivo de alfalfa a las enmiendas oleícolas en el suelo inoculado con *Sinorhizobium* y micorrizas (FB) fue similar a la observada en el suelo sin fertilización (NF), aunque en este tipo de suelo el alperujo natural no disminuyó los valores de la parte aérea del cultivo (Figura VI.3).

VI. Utilización de alperujos, natural o biodegradados como enmiendas orgánicas del suelo

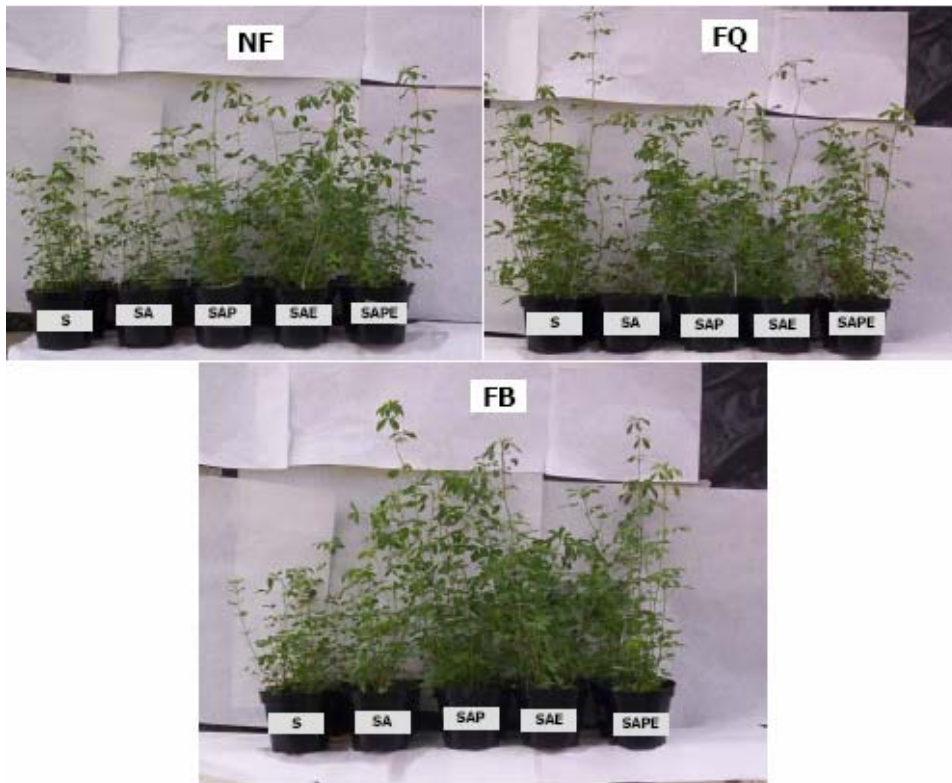


Foto VI.1. Desarrollo del cultivo de alfalfa en cada uno de los tratamientos y series desarrolladas. S: suelo; SA: suelo + alperujo; SAP: suelo + alperujo degradado con *P. ostreatus*; SAE: suelo + alperujo degradado con *E. foetida*; SAPE: suelo ++ alperujo degradado con *P. ostreatus* y *E. foetida*; NF: sin fertilización o inoculación adicional; FQ: fertilización química, FB: inoculación con rizobio y micorrizas.

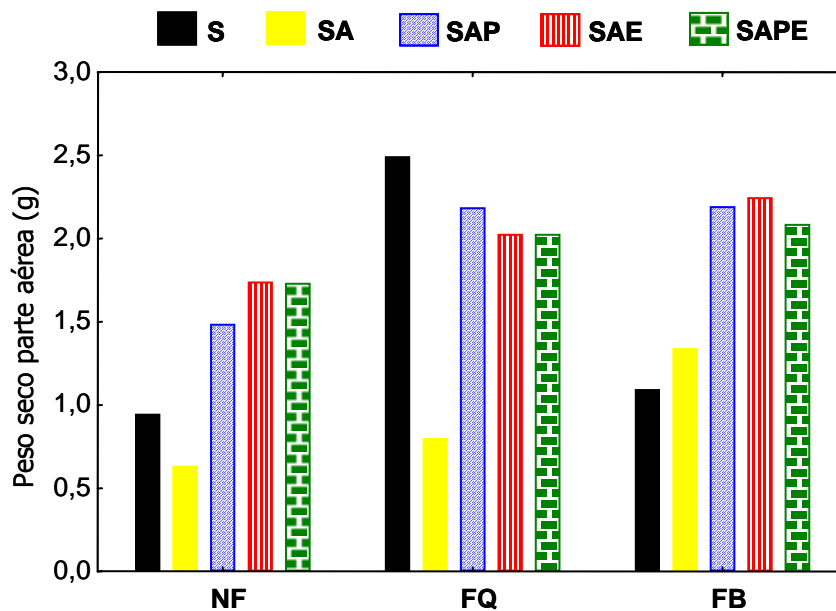


Figura VI.3. Pesos secos de parte aérea de un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, Tabla 15)

Comparativamente, los rendimientos del cultivo de alfalfa aumentaron por la aplicación al suelo de una fertilización química (FQ) o biológica (FB) (Figura VI.3). Entre ambas, no se apreciaron cambios significativos, con la excepción de tratamiento que no incluía enmienda orgánica (S), donde los valores de la parte aérea de alfalfa fueron muy elevados en el caso de la fertilización química. Respecto a las diferentes enmiendas oleícolas aplicadas, aquellas biotransformadas por *E. foetida* (SAE y SAPE) se mostraron más eficientes para aumentar la biomasa de alfalfa en los tres sistemas de fertilización desarrollados.

Los efectos ocasionados por la incorporación al suelo de las diferentes enmiendas oleícolas ensayadas y/o fertilizantes químicos y/o inoculantes sobre los pesos secos de las raíces de alfalfa (Figura VI.4, Anexo-tabla 16) fueron similares a los registrados en la parte aérea, observándose una estrecha correlación ($P < 0,001$) entre ambos parámetros fisiológicos. Por lo general, la fertilización química (FQ) o biológica (FB) aumentó los pesos secos de las raíces respecto a la no fertilización (NF). Respecto al efecto de los diferentes tipos de alperujos aplicados, aquellos biotransformados por *E. foetida* (SAE y SAPE) indujeron los mayores aumentos del peso de las raíces, mientras que la adición del alperujo natural provocó, por lo general, un descenso de este parámetro fisiológico.

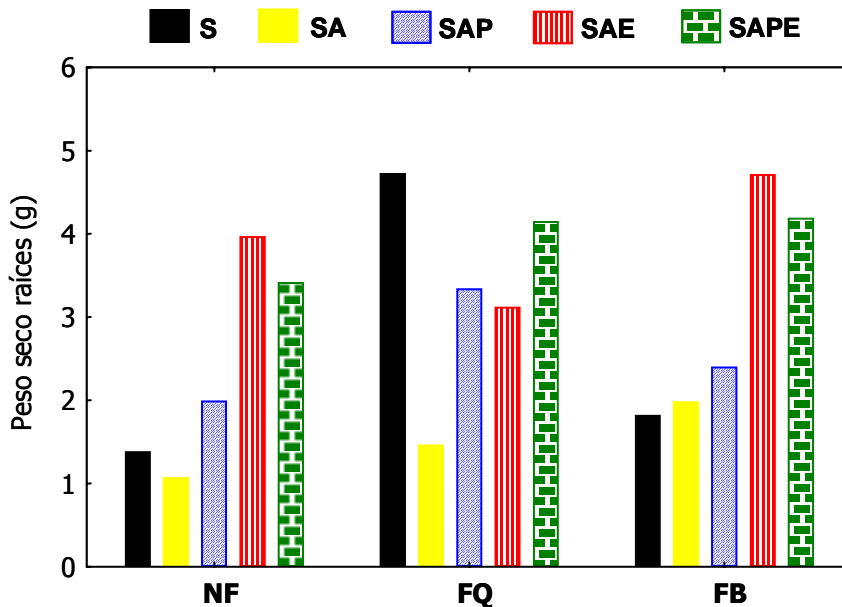


Figura VI.4. Pesos secos de raíces de un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 16)

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en una gran cantidad de estudios en los también se apreciaron aumentos significativos de los rendimientos de cosecha de diferentes cultivos cuando el suelo, natural o fertilizado con NPK, había sido enmendado con residuos orgánicos previamente comportados o vermicompostados (Benítez y col., 2000a, 2001; Galiano y Rodríguez, 1963; Hortenstine y Rothwell, 1972; Kropisz y Wojciechowski, 1978; Nogales y col., 1984; Nogales y Benitez, 2006). Los descensos del peso seco de la parte aérea de la alfalfa en el tratamiento que

incluía alperujo natural (SA) serían debidos a la elevada fitotoxicidad (Tabla VI.2), que presenta este residuo oleícola (Benítez y col., 2004) y concuerdan con los observados en otros estudios en los que se utilizó este subproducto agroindustrial como enmienda del suelo (Benítez y col., 2000a; Nogales y Benítez, 2006).

VI.2.2. NODULACION Y MICORRIZACIÓN

El nitrógeno es muy abundante en la atmósfera, sin embargo, las plantas no pueden utilizarlo en su forma elemental y tienen que obtenerlo del suelo principalmente en forma de nitratos. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio

El proceso de nodulación en las raíces de las leguminosas comienza con el establecimiento de la simbiosis *Sinorhizobium-leguminosa* la cual se inicia con el reconocimiento específico entre la bacteria y su planta hospedadora (De Felipe Antón, 2004). La especificidad de la interacción simbiótica viene dada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta y el rizobio, que activan programas genéticos específicos de nodulación en ambos simbiosis. Los exudados radiculares de las leguminosas, azúcares, aminoácidos, así como compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas, charconas y flavononas) atraen a las bacterias que emigran hacia sus raíces. La respuesta bacteriana consiste en emitir señales genéticas de nodulación, para la activación y transcripción de genes implicados en el proceso simbiótico, que origina la curvatura de los pelos radiculares, la formación de células meristemáticas en la corteza de la raíz (primordio nodular) (De Felipe Antón, 2004).

La aplicación de los alperujos biodegradados al suelo aumento significativamente el número de nódulos de *Sinorhizobium* en las raíces de alfalfa (Figura VI.5, Anexo-tabla 17). Ello tuvo lugar tanto en la serie de tratamientos sin fertilización adicional (NF), como en aquellos que incluían fertilizantes químicos (FQ) o inoculación de esta bacteria y hongos micorrícicos (FB). Comparativamente, los mayores aumentos tuvieron lugar cuando el alperujo había sido degradado conjuntamente por *P. ostreatus* y *E. foetida* (SAPV) y los menores cuando este residuo había sido biodegradado exclusivamente por el hongo *Pleurotus* (SAP). Esos aumentos podrían ser explicados en base a la eficiente mineralización de la materia orgánica que tuvo lugar durante la biodegradación del alperujo por esos agentes biológicos, que le proporcionarían a las enmiendas biodegradadas un apreciable contenido en fitohormonas. Al igual que en otros tipos de organogénesis resulta lógico pensar que los reguladores del crecimiento vegetal tengan un papel en el desarrollo de los nódulos radicales. Sin embargo aún no se ha aclarado qué reguladores están implicados y qué es lo que hacen. Recientes revisiones sobre nodulación (Hirsch, 1992; Verma, 1992; Gresshoff, 1993; Hirsch y Fang, 1994; Mellor y Collinge, 1995) dan esquemas e hipótesis para conectar las fitohormonas con la morfogénesis de los nódulos. La posible presencia de fitohormonas en los alperujos biodegradados no tuvo lugar en el

alperujo natural (SA). Ello conjuntamente con su elevada fototoxicidad provocó que el número de nódulos de *Sinorhizobium* en las raíces de alfalfa se redujera significativamente en el tratamiento SA. El alperujo aparece por tanto como un potencial inhibidor de la nodulación del *Sinorhizobium*, lo cual confirmaría la negatividad de este residuo para ser aplicado, sin biotransformar, directamente al suelo.

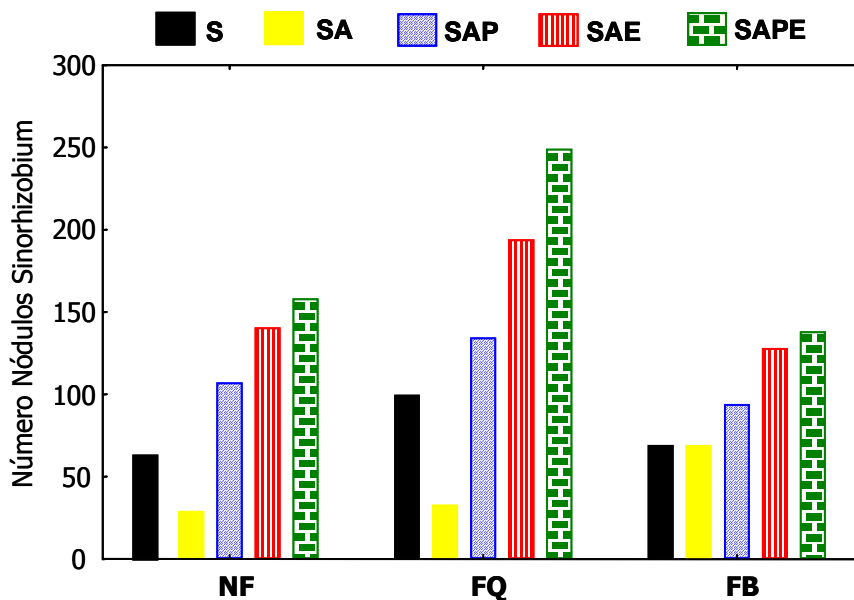


Figura VI.5. Número de nódulos de *Sinorhizobium meliloti* en raíces de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 17)

Comparativamente, el mayor número de nódulos en todos los tratamientos ensayados, se registró cuando el suelo se le había agregado pequeñas cantidades de fertilizante nitrogenado (20 kg N ha^{-1}) (FQ) (Figura VI.5, anexo-tabla 17). La aplicación de dosis pequeñas de N mineral al suelo tiende a estimular la nodulación, alcanzándose hasta un 70-75% de nitrógeno fijado proveniente de la atmósfera (Thies y col., 1992). Este efecto depende de la interacción entre los genotipos del hospedero y el tipo de *Sinorhizobium*. En cambio, la aplicación de altas concentraciones de fertilizante nitrogenado, inhibe la fijación simbiótica del nitrógeno donde la eficiencia para fijar N_2 es dependiente del tipo de *Sinorhizobium* y la leguminosa hospedera (Tamez y Peña-Cabriales, 1989). La inoculación previa de las raíces de alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* (FB) no se tradujo en un aumento del número de nódulos respecto a los tratamientos sin inocular (NF), excepto en el que se aportaba alperujo natural (SA), donde el número de nódulos aumentó un 138%.

Los hongos micorrícicos son un grupo de hongos del suelo que infectan las raíces de la mayoría de las plantas. El mutualismo supone una relación beneficiosa para los dos organismos implicados, y tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación: el hongo coloniza la raíz de la planta y le proporciona nutrientes minerales y agua, que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos que elabora a través de la fotosíntesis.

VI. Utilización de alperujos, natural o biodegradados como enmiendas orgánicas del suelo

La colonización del hongo se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, nunca penetra en la endodermis ni en los tejidos vasculares y meristemáticos (Harley y Smith, 1983); estableciendo una marcada diferencia con las infecciones radicales de hongos patógenos que sí penetran en los haces conductores y meristemas.

El proceso de formación de la simbiosis comienza con la germinación de las esporas de resistencia en el suelo, cuando las condiciones ambientales de temperatura y humedad son favorables (Bolan y Abbott, 1983). Tras la emisión del tubo o tubos germinativos, el micelio del hongo crece hasta encontrar una raíz hospedadora, donde forma entonces una estructura similar a un apresorio y penetra entre las células epidérmicas o a través de los pelos radicales. Después de la penetración comienza la colonización del tejido parenquimático de la raíz. En la capa interna de este tejido se forman los arbuscúlos, producidos por una ramificación masiva de la hifa después de penetrar la pared celular. La colonización del hongo puede extenderse también mediante hifas exteriores (runners) por la superficie de la raíz y penetrar en ésta a intervalos irregulares. Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces; con ello la planta aumenta considerablemente su superficie de absorción, de 100 a 1000 veces.

Tabla VI.4 Frecuencia de micorrización en raíces de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 18)

	NF	FQ	FB
	%		
S	99	97	100
SA	97	94	98
SAP	93	100	100
SAE	91	81	99
SAPE	94	94	100

Los valores expuestos en la tabla VI.4 y anexo, tabla 18 dejaron patente que el porcentaje de micorrización está prácticamente extendido a todas las plantas de alfalfa utilizadas en este estudio, independientemente del tratamiento aplicado y serie de fertilización considerada. Ello es explicable debido a que las asociaciones micorrícicas se producen en casi todas las plantas vasculares (Azcón-Aguilar y Barea, 1997), donde se incluye la ensayada en estudio. En plantas que han sido infectadas por hongos micorrícicos, el hongo es de hecho el método principal de captación de nutrientes, y no las raíces. Aunque no se observaron diferencias significativas entre las diferentes enmiendas oleícolas aplicadas y series consideradas, la inoculación del suelo con *Glomus mosseae*

(FB) dio lugar a un ligero aumento de la frecuencia de micorrización de las raíces de alfalfa, que excepto en el tratamiento que incluía alperujo natural (SA) fue del 100%.

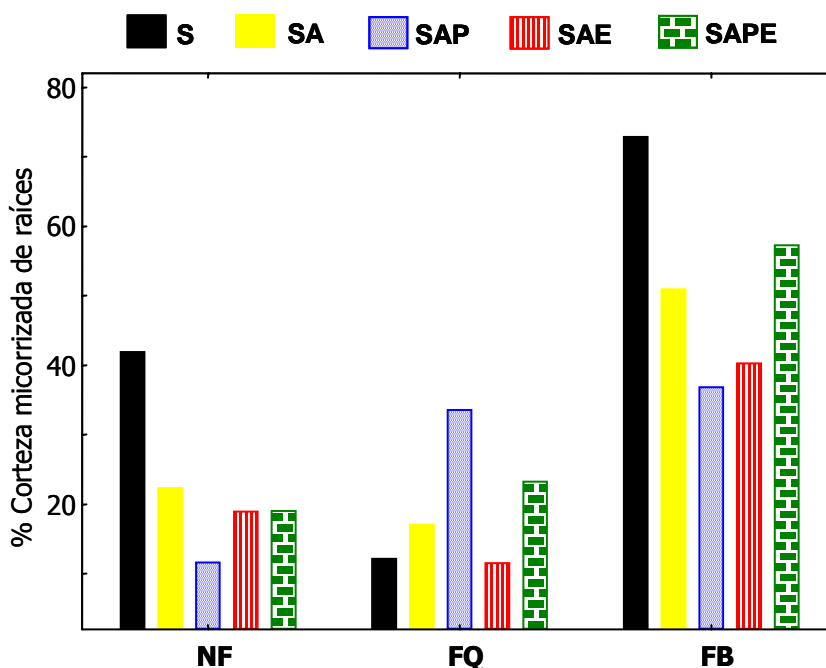


Figura VI.6. Porcentaje de corteza micorrizada de raíces de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 19)

Pese a que el porcentaje de micorrización estuvo extendido en todas las plantas de alfalfa, la cantidad de corteza micorrizada en las raíces de ellas varió significativamente entre tratamientos y series ensayadas (Figura VI.6, Anexo-tabla 19). La mayor cantidad de corteza micorrizada de raíces se observó en los suelos que habían recibido una inoculación artificial con este hongo (FB), donde el porcentaje, globalmente, superó en un 160% respecto a los suelos fertilizados químicamente (FQ) y en un 125% en relación a los suelos sin fertilizar (NF). La aplicación de las diferentes enmiendas oleícolas ensayadas tanto al suelo sin fertilizar (NF) como inoculado con este hongo se mostró muy poco eficaz para aumentar la cantidad de corteza micorrizada, ya que en todos los casos la disminuyeron respecto al suelo sin enmendar. Este efecto no tuvo lugar en el suelo fertilizado químicamente, donde se apreciaron aumentos, significativos cuando el suelo había sido enmendado con alperujo biodegradado por *P. ostreatus* (SAP).

VI.2.3. pH Y CONDUCTIVIDAD DEL SUELO POSCOSECHA

El suelo utilizado en el estudio presentó un pH ligeramente alcalino (8,4) y un elevado contenido en carbonatos. La aplicación de las diferentes enmiendas oleícolas ensayadas directamente al suelo (NF), o, en combinación con fertilizantes químicos (FQ) o inoculación con microorganismos simbióticos

alteró escasamente este parámetro (Tabla VI.5, anexo-tabla 20), pese a que ellas presentaban acusadas diferencias de su pH (Tabla VI.2). Estas escasas diferencias (entre 8,4 y 8,7) pondrían de manifiesto el marcado carácter tampón que presenta el suelo, el cual amortiguaría los posibles cambios de su pH inducido por el aporte de las enmiendas orgánicas ensayadas.

Tabla VI.5. pH y conductividad del suelo poscosecha en los diferentes tratamientos ensayados. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: pH, Anexo, tabla 20; conductividad, Anexo, tabla 21)

	pH			Conductividad dS m ⁻¹		
	NF	FQ	FB	NF	FQ	FB
S	8.5	8.5	8.6	0.18	0.19	0.20
SA	8.6	8.5	8.7	0.28	0.32	0.21
SAP	8.6	8.7	8.4	0.20	0.20	0.23
SAV	8.5	8.4	8.5	0.22	0.21	0.22
SAPV	8.4	8.4	8.4	0.18	0.17	0.21

De forma similar a lo observado en el pH, la conductividad del suelo después de la recogida del cultivo se encontró escasamente modificada por la aplicación de los diferentes tipos de alperujo y/o fertilizantes químicos y/o inoculación con Sinorhizobium y micorrizas (tabla VI.5, anexo-tabla 21). Las mayores variaciones se observaron en los tratamientos que incluían alperujo natural, en los que se observó un aumento no significativo de la salinidad del suelo. En todo caso, los valores de conductividad que variaron entre 0,18 y 0,32 dS m⁻¹, fueron bajos y permitirían el desarrollo adecuado de todos los cultivos (Maas, 1984).

VI.2.4. NITROGENO EN PLANTA

En general, las concentraciones de nitrógeno registradas en la parte aérea de alfalfa (Tabla VI.6, anexo-tabla 22) no fueron muy elevadas, aunque en ningún caso se observaron deficiencias de este nutriente en el cultivo ensayado. La aplicación de alperujo natural al suelo (SA) disminuyó apreciablemente la concentración de nitrógeno de la parte aérea del cultivo de alfalfa (Tabla VI.6), tanto en el suelo sin fertilizar (NF) como en el fertilizado químicamente (FQ) o inoculado con microorganismos simbióticos (FB). La aplicación de los alperujos biodegradados (SAP, SAE y SAPE) modificó escasamente los niveles de este nutriente en la planta, observándose únicamente un ligero aumento de ellos cuando la enmienda de suelo estuvo constituida por alperujo bioidegradado por *E. foetida*. Comparativamente, y de forma global, no se registraron variaciones apreciables de la concentración de nitrógeno en alfalfa ente los tres sistemas de fertilización ensayados.

Tabla VI.6. Concentración de nitrógeno (g kg^{-1}) en parte aérea de un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 22)

	NF	FQ	FB
	g kg^{-1}		
S	14	15	14
SA	9,5	10	12
SAP	12	14	14
SAE	16	17	16
SAPE	15	13	14

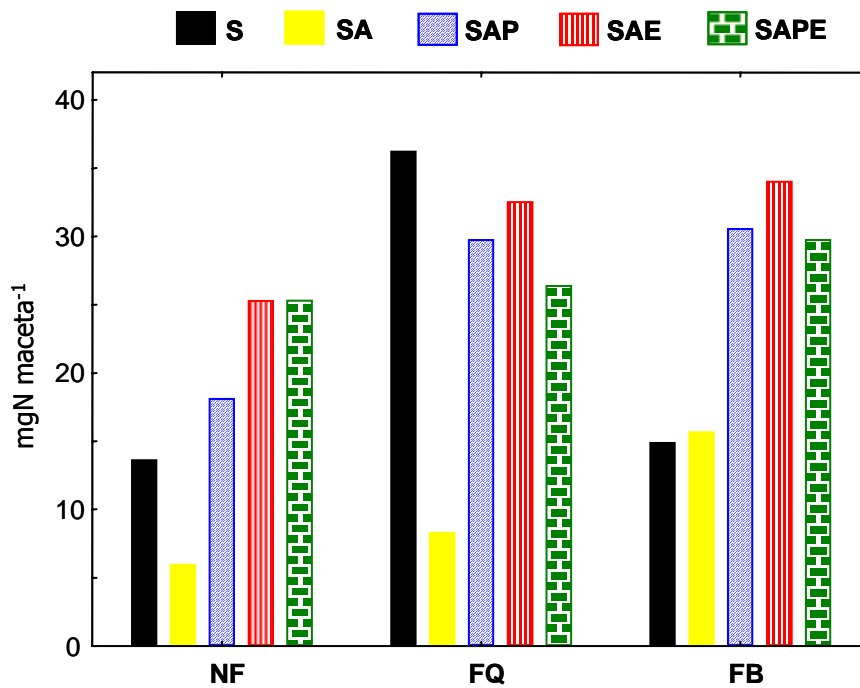


Figura VI.7. Extracción de nitrógeno por un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 23)

A diferencia de lo observado a nivel de concentración, la extracción de nitrógeno por el cultivo varió significativamente dependiendo del tipo de enmienda aplicada al suelo y del tipo de fertilización utilizada en el experimento (Figura VI.7, anexo-tabla 23), correlacionándose ($P < 0,001$) los valores obtenidos con los registrados a nivel de pesos seco de parte aérea de alfalfa. La aplicación de alperujo (SA) redujo significativamente la extracción de ese nutriente por la planta especialmente cuando el

suelo había sido suplementado con una pequeña dosis de fertilizante nitrogenado mineral (FQ). Esa reducción fue de un 77% respecto al suelo sin enmendar. Los descensos inducidos por esta enmienda se encontrarían relacionados, por una parte, con su elevada relación C/N (64), la cual provocaría una inmovilización de N disponible del suelo (Alexander, 1980). Por otra, la elevada fototoxicidad de esta enmienda podría haber afectado negativamente a la capacidad de los nódulos de *Sinorhizobium* en las raíces de las plantas para fijar N atmosférico. La aplicación de los diferentes alperujos biodegradados tendieron a aumentar la extracción de N por la alfalfa, especialmente cuando se aplicaron al suelo natural (NF) o previamente inoculado con microorganismos simbióticos. Aunque teóricamente el alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y *E. foetida* (APE) suministraría la mayor cantidad de nitrógeno al suelo (Tabla VI.2), fue el alperujo biodegradado exclusivamente por *E. foetida* (AE) el que resultó más eficaz para incrementar la extracción de este nutriente por la planta. Ello podría ser debido a que el nitrógeno contenido en esta enmienda oleícola se encontraría en forma más disponible para el cultivo, o bien que este material orgánico favorecería la efectividad de la conversión del N atmosférico en N amoniacal asimilable por las plantas que tiene lugar en los nódulos rizobiales. Este efecto ha sido observado en otros estudios, en los que se puso de manifiesto que la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo estimuló la nodulación y la fijación de N por las plantas (Zengeni y col., 2006).

VI.2.5. FOSFORO EN PLANTA Y SUELO POSCOSECHA

Tabla VI.7. Concentración de fósforo (g kg^{-1}) en parte aérea de un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 24)

	NF	FQ	FB
	g kg^{-1}		
S	1.9	2.7	2.0
SA	1.8	2.6	2.7
SAP	2.4	2.8	3.9
SAE	2.7	2.8	2.6
SAPE	2.7	3.8	3.3

Las concentraciones de fósforo en la parte aérea del cultivo de alfalfa se encontraron, excepto en los tratamientos S y SA de la serie sin fertilización (NF), dentro de los rangos de suficiencia establecidos para este cultivo (Kelling, 2000; Koenig y col., 1999) (Tabla VI.7, anexo-tabla 24). La aplicación al suelo de las tres enmiendas oleícolas biodegradadas aumentó significativamente la concentración de P en la parte aérea del cultivo, tanto en el suelo sin fertilizar como en el suelo

fertilizado químicamente (FQ) o inoculado con Sinorhizobium y micorrizas. Comparativamente, los alperujos biodegradados con *P. ostreatus* sólo (SAP) o en combinación con *E. foetida* (SAPE) se mostraron mas eficaces para aumentar la concentración de este nutriente en planta que el alperujo biodegradado exclusivamente con *E. foetida*. La aplicación de NPK al suelo (FQ) o su inoculación con micorrizas (FB) aumentó la concentración de P en planta respecto al suelo sin fertilizar (NF), no apreciándose, globalmente, diferencias significativas entre ambos tipos de fertilización.

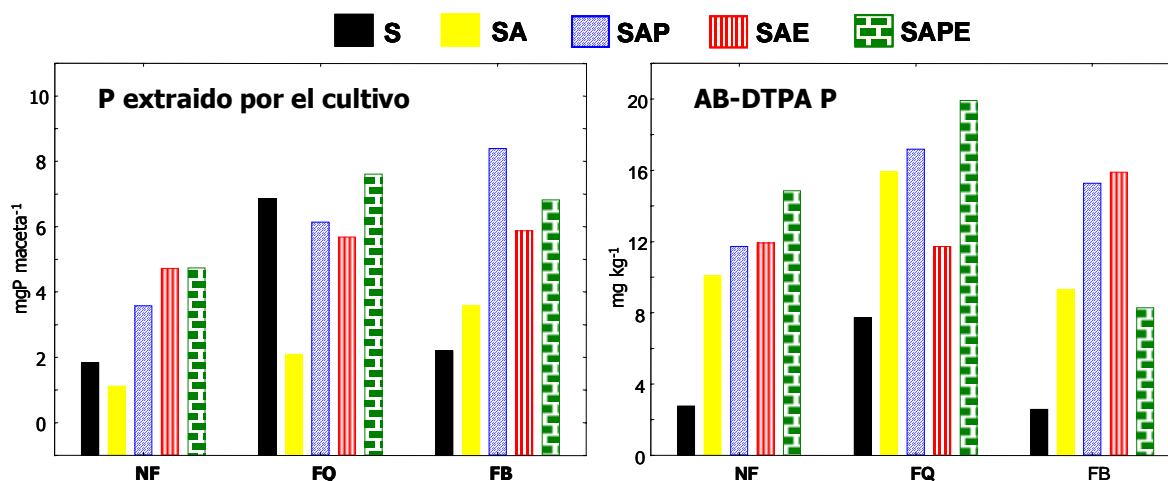


Figura VI.8. Extracción de fósforo por un cultivo de alfalfa y concentración de P extraído con AB-DTPA del suelo después de la recogida del cultivo. Valores medios de tres repeticiones. ((ANOVA y contrastes post hoc: P extraído por el cultivo, Anexo, tabla 25; AB-DTPA P, Anexo, tabla 26)

Los alperujos biodegradados se mostraron eficaces para suministrar fósforo al cultivo de alfalfa, ya que su extracción por la planta fue, en los tratamientos que incluían esas enmiendas (SAP, SAE y SAPE), significativamente más elevada que la registrada en el suelo sin enmendar (S) o el enmendado con alperujo natural (SA) (Figura VI.8, anexo-tabla 25). Los aumentos de fósforo registrados en planta e inducidos por esas enmiendas oleícolas biodegradadas también se observaron en el suelo, donde después de la recogida del cultivo, los niveles de fósforo asimilable (extraído con AB-DTPA) fueron significativamente mas elevados (Figura VI.8, tabla 26). Además en el tratamiento que incluía alperujo natural también se observó un incremento de los niveles de P asimilable del suelo en el suelo.

Los resultados obtenidos dejaron patente que las enmiendas constituidas por alperujos biodegradados favorecieron el suministro de fósforo al cultivo de alfalfa y enriquecieron en fósforo disponible al suelo en los tres sistemas de fertilización ensayados. Estos resultados concuerdan con lo observado en otros estudios sobre la capacidad que presentan la mayoría de las enmiendas orgánicas para aumentar los niveles de P en suelos y plantas (Benítez y col., 2000a; Erich y col., 2002; Gallardo-Lara y Nogales, 1987; García-Gil, 2001; Hadas y col., 2004; Moreno y col., 1996). Esos aumentos que tienen lugar tanto en suelos ácidos como calcáreos, se encuentran, fundamentalmente, relacionados con la cantidad de fósforo aportado por la enmienda orgánica (Quedraogo y col., 2001; Soumare y

col., 2002). En nuestro estudio ello se puso de manifiesto ya que los dos alperujos biodegradado por *P. ostreatus*, que tenían una mayor concentración de fósforo, fueron a su vez los mas efectivos para aumentar los valores de este nutriente en planta y suelo. Además de este suministro de fósforo al suelo, la mineralización de las enmiendas oléícolas, especialmente el alperujo natural, en el suelo podría haber liberado compuestos ácidos, que en suelos calcáreos, favorecerían el aumento de la asimilabilidad del fósforo mineral contenido en el suelo (Braschi y col., 2003). También la interacción de la materia orgánica, incorporada por las enmiendas, con las arcillas podría haber reducido la adsorción del P mineral de suelo, aumentando las formas asimilables de ese nutriente en el medio edáfico (Hue, 1990,91). La aplicación de fertilizantes químicos (FQ) o biológicos (micorrizas), lógicamente aumentaron los valores de fósforo en suelo y planta, aunque comparativamente ambos sistemas mostraron una eficacia similar.

VI.2.6. POTASIO EN PLANTA Y SUELO POSCOSECHA

En todos los tratamientos ensayados, la concentración de potasio en la parte aérea del cultivo de alfalfa se encontró dentro del rango de suficiencia establecido para este cultivo forrajero (Kelling, 2000; Koenig y col., 1999). La aplicación de las diferentes enmiendas oleícolas al suelo tendió a aumentar las concentraciones de este nutriente, aunque en la mayoría de ellos esos aumentos no tuvieron un carácter significativo (Tabla VI.8, anexo-tabla 27). Asimismo la aplicación al suelo de NPK (FQ) o su inoculación con Sinorhizobium o micorrizas (FB) no provocó cambios apreciables sobre la concentración de potasio respecto a su no incorporación (NF).

Tabla VI.8. Concentración de potasio (g kg^{-1}) en parte aérea de un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Anexo, tabla 27).

	NF	FQ	FB
S	23	22	21
SA	20	24	28
SAP	27	25	26
SAE	24	29	24
SAPE	23	22	23

Pese a los escasos cambios registrados a nivel de concentración, la extracción de este potasio por el cultivo aumentó cuando el suelo había sido enmendado con cada uno de los alperujos biodegradados (AP, AE y APE) (Figura VI.9, anexo-tabla 28). Estos aumentos significativos tuvieron lugar tanto en el suelo sin fertilizar (NF) como en el suelo inoculado con microorganismos simbióticos (FB). En cambio en el suelo fertilizado con NPK (FQ), las enmiendas oleícolas ensayadas, o no

provocaron cambios significativos (SAP y SAE) o disminuyeron significativamente (SA y, en menor medida SAPE) la extracción de K por la planta. Además en el suelo fertilizado con NPK fue donde se registraron los mayores valores, con la excepción del tratamiento SA, de extracción de potasio por el cultivo de alfalfa.

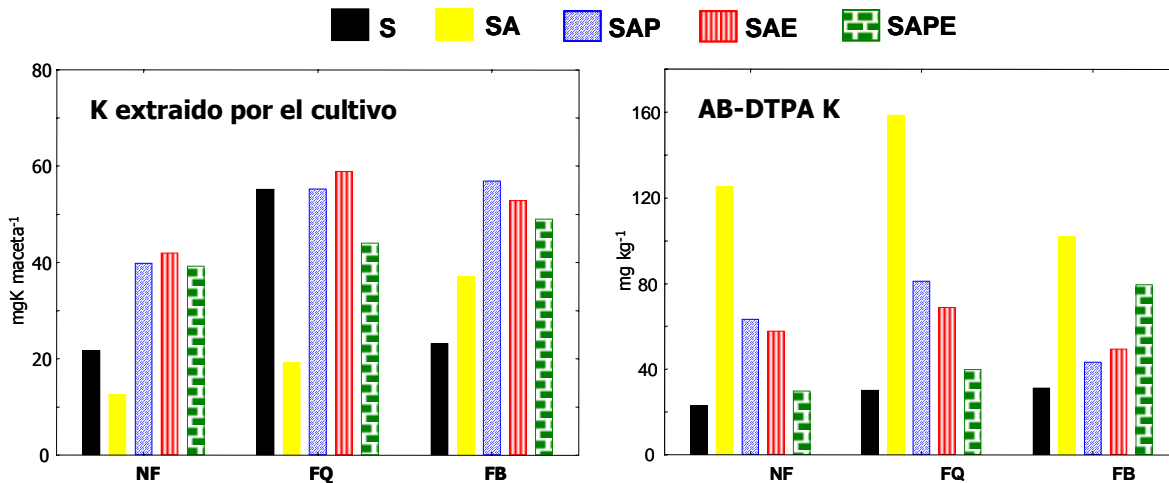


Figura VI.9. Extracción de potasio por un cultivo de alfalfa y concentración de P extraído con AB-DTPA del suelo después de la recogida del cultivo. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: K extraído por el cultivo, Anexo, tabla 28; AB-DTPA K, Anexo, tabla 29)

Después de la recogida del cultivo de alfalfa, los niveles de potasio asimilable del suelo fueron significativamente más altos en aquellos tratamientos en los que el suelo había sido enmendado con alperujo natural o previamente biotransformado por *P. ostreatus* o/y *E. foetida* (Figura VI.9. anexo-tabla 29). Específicamente, esas concentraciones fueron excepcionalmente elevadas en el tratamiento que incluía alperujo natural (SA), tanto si este residuo había sido aplicado al suelo sin fertilizar (NF), fertilizado químicamente (FQ) o inoculado con microorganismos simbióticos (FB). Los aumentos registrados se encontraron comprendidos entre un 225 y un 440% respecto al suelo sin enmendar con ese residuo oleícola.

Los resultados en planta y suelo pusieron de manifiesto que los alperujos biodegradados tienen una elevada capacidad para suministrar potasio de forma inmediata al cultivo vegetal. Además, esas enmiendas, así como el residuo natural promueven un acusado enriquecimiento de potasio asimilable por el suelo. Los aumentos observados estarían probablemente relacionados con el contenido relativamente elevado de potasio que presentaron los diferentes tipos de alperujos ensayados en este estudio, como ocurre con otros residuos generados por la agroindustria del olivar (alpechines, orujos 3 fases, composts de alpechines, orujillos, cenizas de alperujo (Gallardo-Lara y col., 1995; Benítez y col., 2000a, Nogales y col., 2006). Al igual que lo observado con otras enmiendas orgánicas (Gallardo-Lara y Nogales, 1987; Larcheveque y col., 2006), el potasio contenido en los diferentes tipos de alperujo debe encontrarse, mayoritariamente, en forma soluble, lo cual favorece su rápida transferencia al suelo y cultivos vegetales.

VI.2.8. MICRONUTRIENTES EN PLANTA Y SUELO POSTCOSECHA

Tabla VI.9. Concentración (g kg^{-1}) de hierro, manganeso, cobre y zinc en parte aérea de un cultivo de alfalfa. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: concentración de Fe en planta, Anexo, tabla 30; concentración de Mn en planta, Anexo, tabla 31; concentración de Cu en planta, Anexo, tabla 32; concentración de Zn en planta, Anexo, tabla 33)

	Hierro			Manganeso			Cobre			Zinc		
	NF	FQ	FB	NF	FQ	FB	NF	FQ	FB	NF	FQ	FB
S	116	124	250	17	19	20	6	6	8	24	25	16
SA	117	106	102	74	75	60	5	3	6	21	15	22
SAP	87	90	125	44	37	32	7	7	6	16	25	37
SAV	88	126	72	27	27	33	10	8	7	27	26	27
SAPV	100	107	102	36	37	33	8	7	10	21	24	36

La aplicación de las diferentes enmiendas oleícolas disminuyó, con alguna excepción, la concentración de hierro en la parte aérea del cultivo tanto en el suelo sin fertilizar (NF), como en el fertilizado químicamente (FQ) o inoculado con microorganismos simbióticos (Tabla VI.9, anexo-tabla 30). En cambio, esas enmiendas se mostraron muy efectivas para aumentar la concentración de manganeso en la parte aérea de la alfalfa, particularmente la constituida por alperujo natural (SA) (Tabla VI.9, anexo-tabla 31). Las concentraciones de cobre y zinc del cultivo se encontraron menos afectadas por el aporte de los diferentes alperujos ensayados, aunque por lo general, la aplicación de alperujo natural tendió a disminuirlas respecto a los otros tratamientos ensayados (Tabla VI.9, anexo tablas 32 y 33). La aplicación de NPK o la inoculación del suelo con rhizobios y micorrizas, por lo general tuvo poco efecto sobre las concentraciones de manganeso y cobre, mientras que las del zinc, en aquellos tratamientos que incluían alperujo degradado por *P. ostreatus* aumentaron significativamente. En todo caso, las concentraciones de los micronutrientes analizados en la parte aérea del cultivo de alfalfa se encontraron dentro de los rangos de suficiencia establecidos para este cultivo vegetal (Jones y col., 1991; Kelling, 2000; Koenig y col., 1999; Marschner, 1995)

La extracción de hierro por el cultivo de alfalfa se encontró, en general, escasamente modificada por la aplicación de los alperujos biotransformados por *P. ostreatus* o/y *E. foetida* (Figura VI.10, anexo-tabla 34). En cambio, el aporte de alperujo natural la redujo significativamente (SA). La fertilización del suelo con NPK o su inoculación con microorganismos simbiotes aumentó, en todos los tratamientos ensayados, la extracción de Fe por la planta. En cambio, en el suelo poscosecha, la asimilabilidad del hierro (extraído con AB-DTPA) aumentó significativamente por el aporte de los diferentes tipos de alperujo, siendo estos aumentos muy acusados cuando el suelo fue abonado por

alperujo natural (SAP) (Figura VI.10, anexo-tabla 35). La fertilización (FQ) o inoculación (FB) de suelo tendió a disminuir los valores de Fe asimilable en este medio respecto a su no fertilización (NF).

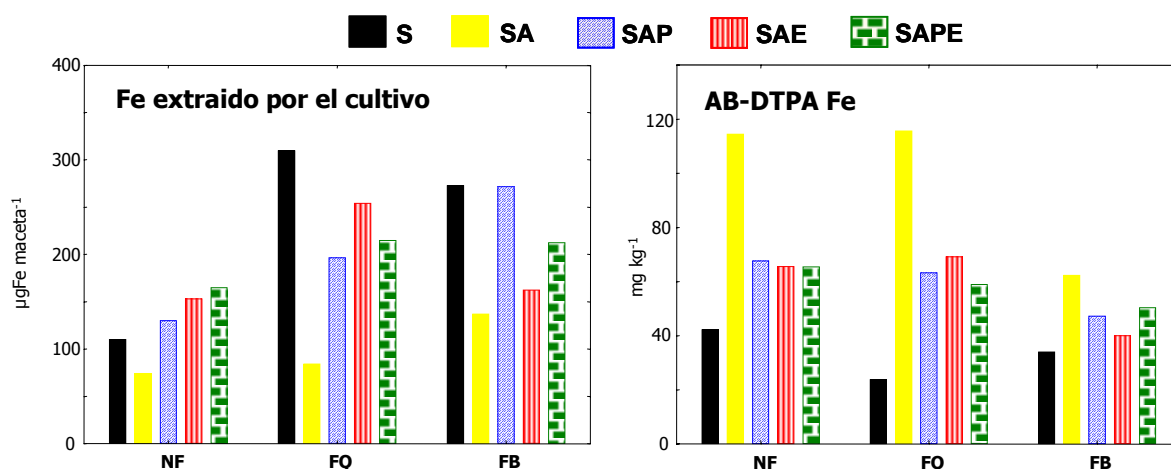


Figura VI.10. Extracción de hierro por un cultivo de alfalfa y concentración de Fe extraído con AB-DTPA del suelo después de la recogida del cultivo. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Fe extraído por el cultivo, Anexo, tabla 34; AB-DTPA Fe, Anexo, tabla 35)

Los resultados obtenidos, dejaron patente que las diferentes enmiendas oleícolas utilizadas tuvieron una escasa capacidad para aumentar los niveles de hierro en la planta. A nivel de suelo, sí se mostraron más efectivas para aumentar su asimilabilidad, aunque los incrementos observados no se encontrarían relacionados con la cantidad de hierro aportada por cada tipo de alperujo (mayor en los biodegradados que en el natural, Tabla VI.2). Los aumentos de la asimilabilidad de Fe serían debidos posiblemente por la descomposición de las enmiendas oleícolas en el suelo, que podrían, particularmente el alperujo natural, liberar compuestos orgánicos quelantes (ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, ácidos fúlvicos) que aumentarían la asimilabilidad del Fe insoluble del suelo (Baca y col., 1992; Lindsay, 1991; Strevenson, 1991). Además, la degradación biológica de la materia orgánica incorporada al suelo podría emitir electrones y otros agentes reductores, favoreciendo las condiciones reductoras del suelo, lo cual aumentaría la solubilidad y asimilabilidad del Fe en este medio (Lindsay, 1991; Alexander, 1980).

A diferencia de lo observado anteriormente, la extracción de manganeso por la planta aumentó significativamente cuando el suelo fue suplementado con las diferentes enmiendas oleícolas (SA, SAP, SAE y SAPE) (Figura VI.11, anexo-tabla 36). Esos aumentos se correlacionaron ($p < 0,001$) con los observados en el suelo poscosecha, donde la asimilabilidad de Mn se incrementó por el aporte de los diferentes tipos de alperujo (Figura VI.11, anexo-tabla 37). Comparativamente, no se apreciaron diferencias significativas de manganeso a nivel de suelo y planta entre los diferentes tipos de alperujos aplicados, aunque por lo general la aplicación del alperujo biodegradado por *P. ostreatus* aumentó ligeramente los valores de ese nutriente. La aplicación de NPK (FQ) o la inoculación del suelo

con microorganismos simbiotes tuvieron poco efecto sobre los niveles de Mn asimilable del suelo, mientras que la extracción de este por la planta aumentó significativamente.

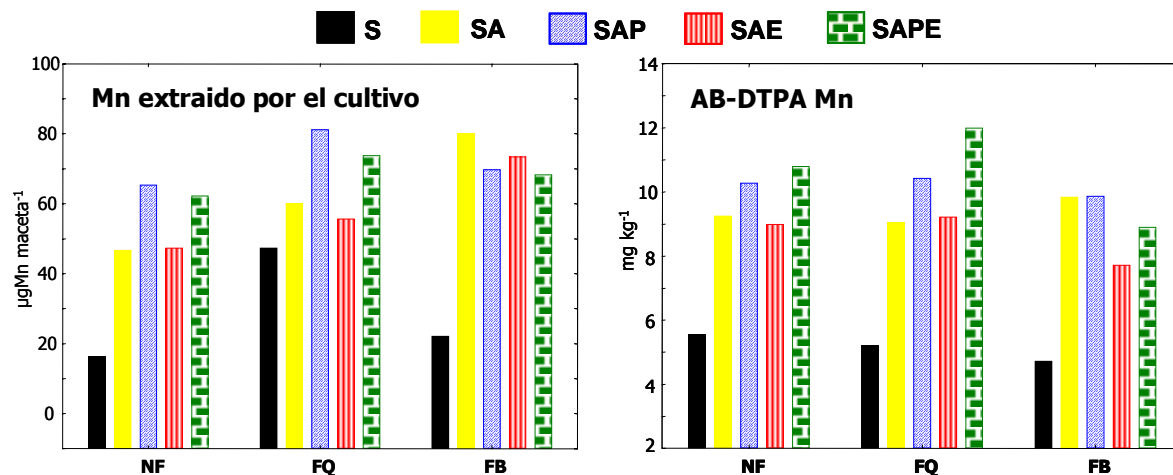


Figura VI.11. Extracción de manganeso por un cultivo de alfalfa y concentración de Mn extraído con AB-DTPA del suelo después de la recogida del cultivo. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Mn extraído por el cultivo, Anexo, tabla 36; AB-DTPA Mn, Anexo, tabla 37)

Estos resultados pusieron de manifiesto que los diferentes tipos de alperujos ensayados presentaron una moderada capacidad para aumentar los niveles de Mn en planta y los asimilables de en el suelo. Estos aumentos, observados también en otros estudios donde se aplicaron diferentes tipos de enmiendas orgánicas (Baca y col., 1992; Benítez, 1996; García-Gil, 2001) serían debidos, por una parte, a la entrada de este micronutriente en el suelo a través de los diferentes alperujos aplicados. Sin embargo, ello no debe ser la única explicación, ya no se observó una correlación entre los niveles de Mn en planta y suelo y los contenidos de este elemento en cada uno de los alperujos ensayados. Por ello, y además, otros mecanismos y/o efectos podrían haber tenido lugar en el suelo que expliquen los aumentos observados: a) Posible disminución del potencial de oxido-reducción del suelo, debido a la degradación de las enmiendas orgánicas adicionadas al mismo, que favorecería la asimilabilidad de Mn (Baca y col., 1992), b) liberación al suelo de compuestos orgánicos, inducidas por el aporte de los diferentes alperujos, que favorecerían la formación de complejos enlazados débilmente al Mn, aumentando su asimilabilidad (Marschner, 1995; Stevenson, 1986; Tate, 1987), c) neo-formación de ácidos húmicos en el suelo, los cuales presentarían una bien definida selectividad para la formación de complejos que se unirían fuertemente con algunos metales pesados de suelo, desplazando a su solución otros más lábiles como el Mn.

La aplicación de los alperujos biodegradados por *P. ostreatus* o/y *E. foetida* aumentaron significativamente la extracción de zinc, y en menor medida de cobre por el cultivo de alfalfa (Figura VI.12, anexo-tablas 38 y 40). En cambio el aporte de alperujo natural disminuyó la captación de ambos micronutrientes por el cultivo ensayado, especialmente en el suelo sin fertilizar (NF) y en el suelo fertilizado con NPK (FQ). Comparativamente, la aplicación de fertilizantes químicos al suelo (FQ) o la inoculación con rizobios y micorrizas aumentó la extracción de ambos micronutrientes por el

cultivo respecto al suelo sin fertilizar (NF), aunque esos aumentos fueron mas significativo para el caso del zinc. A nivel de suelo poscosecha (Figura VI.12, anexo 39 y 41), donde la extractabilidad con AB-DTPA de ambos micronutrientes fue baja, la aplicación de los alperujos biodegradados con *P. ostreatus*, solo (SAP) o conjuntamente con *E. foetida* (APE) tendió a aumentarla significativamente. En los otros tratamientos que incluían enmiendas oleícolas, los cambios respecto al suelo control fueron menos acusados. En general, la aplicación de NPK (FQ) o de inóculos (FB) al suelo tuvo poco efecto sobre la asimilabilidad de ambos elementos.

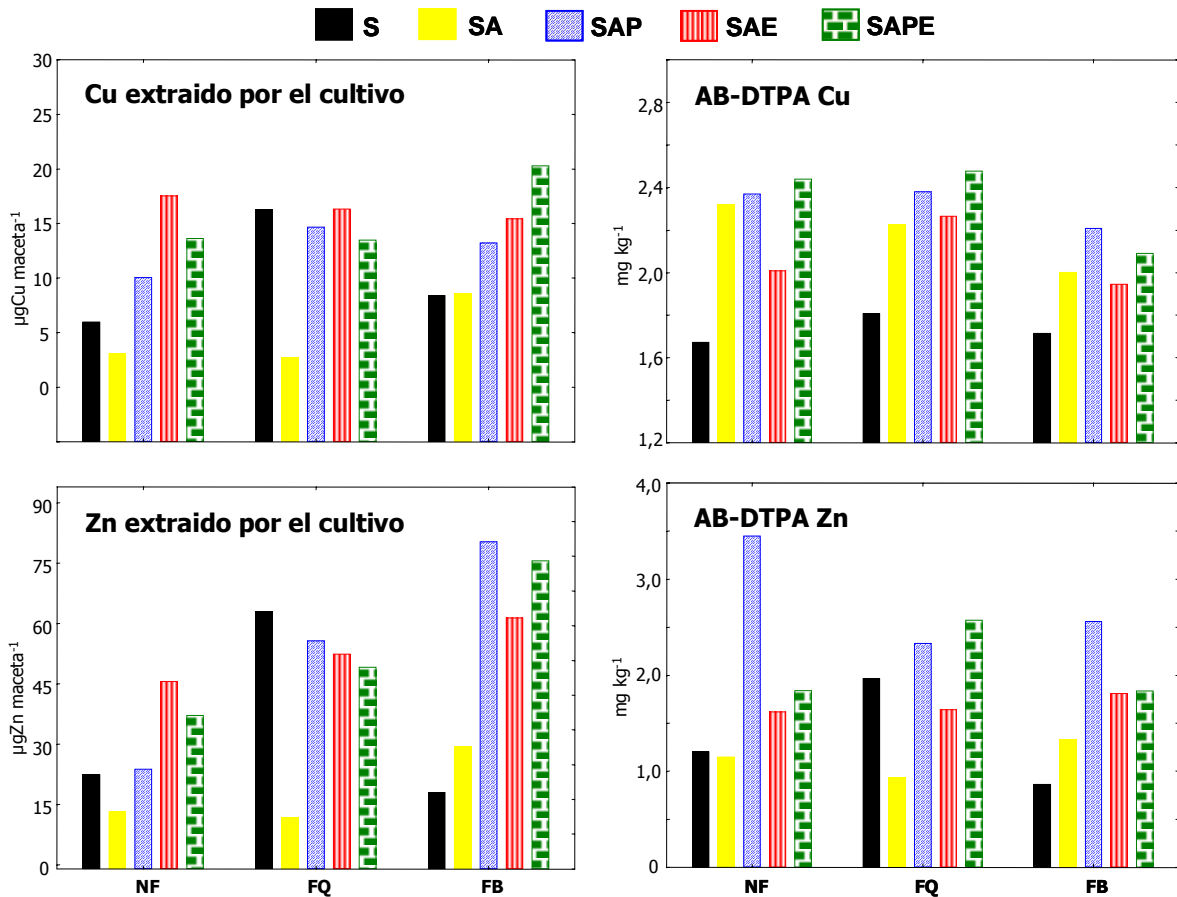


Figura VI.12. Extracción de cobre y zinc por un cultivo de alfalfa y concentración de Cu y Zn extraído con AB-DTPA del suelo después de la recogida del cultivo. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: Cu extraído por el cultivo, Anexo, tabla 38; AB-DTPA Cu, Anexo, tabla 39; Zn extraído por el cultivo, Anexo, tabla 40; A-DTPA Zn, anexo, tabla 41).

En otros estudios se ha puesto de manifiesto que la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo producen aumentos, descensos o no afectan a la concentración y extracción de Cu y Zn por los cultivos vegetales y a la extractabilidad y asimilabilidad de ambos elementos en el suelo (King y col., 1977; Nogales y Benítez, 2006; Romero y col., 2005; Soumaré y col., 2003). Se ha constatado que esas discrepancias son debidas, por una parte, al tipo de enmienda orgánica adicionada, su contenido en esos elementos y su grado de estabilidad y madurez (Gallardo y Nogales, 1987). Por otra, a las características del suelo como pH, temperatura, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico,

contenido y naturaleza de su materia orgánica y contenido en esos elementos (Ellis and Knezek, 1972; Olsen, 1972; Webber, 1980; Kabata-Pendias y Pendias, 1984; Adriano, 1986). Por último, a las características del cultivo vegetal que se desarrolle y a las interacciones con otros nutrientes (Adriano, 1986).

En nuestro estudio los diferentes alperujos ensayados tuvieron una limitada capacidad para suministrar Cu y Zn al suelo y planta. Ello fue debido a que esas enmiendas presentaron concentraciones bajas de ambos nutrientes (entre 9 y 29 mg Cu kg⁻¹ y 10 y 56 mg Zn kg⁻¹, Tabla VI.2). Esos niveles son menores que los registrados en otras enmiendas orgánicas como aquellas generadas por los núcleos de población (Gallardo-Lara y Nogales, 1987; Moreno y col; 1996). Por tal motivo, los aumentos y descensos observados serían producidos por algunos de los efectos indirectos que la aplicación de enmiendas orgánicas ejercen, simultáneamente, sobre la asimilabilidad de Cu y Zn en suelos: a) formación de complejos de Cu y Zn con compuestos orgánicos de bajo peso molecular, aminos y ácidos fúlvicos que la aumentan, b) formación de complejos orgánicos insolubles de Cu y Zn que la disminuyen, c) liberación de exudados y ligandos por las raíces que pueden complejar Cu y Zn en la rizosfera, d) aumento o disminución de la asimilabilidad de esos elementos debido a microorganismos con potencial inmovilizador o mineralizante (Adriano, 1986; Fagaria y col., 2002; Lindsay, 1972; Nogales y col., 1997).

VI.2.9. FRACCIONES ORGÁNICAS EN SUELO

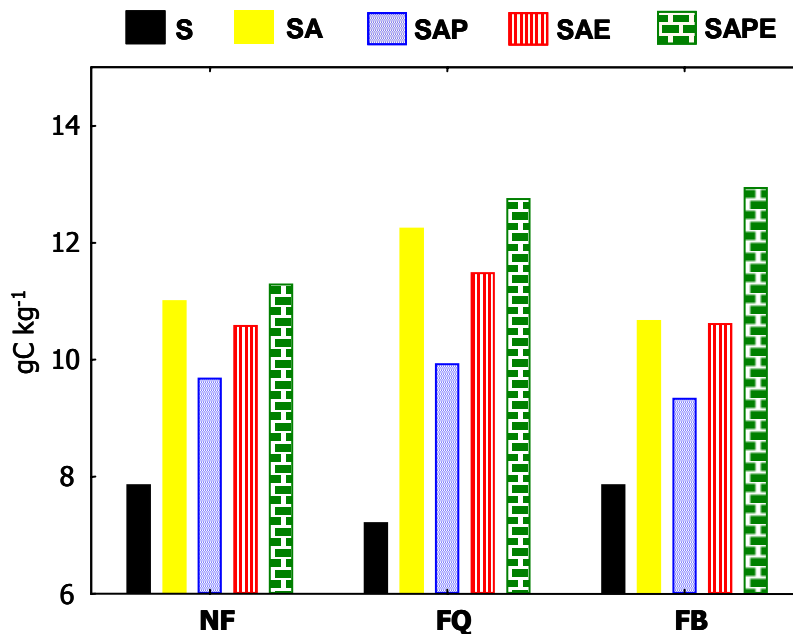


Figura VI.13. Carbono orgánico total en el suelo poscosecha en los diferentes tratamientos ensayados. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: anexo, tabla 42)

El carbono orgánico total engloba todas las fracciones orgánicas susceptibles de ser oxidadas, por lo que sus variaciones constituyen una herramienta informativa de los procesos que sigue la materia

orgánica de los suelos que han recibido distintos tratamientos. La incorporación de las cuatro enmiendas orgánicas al suelo aumentó significativamente los niveles de carbono orgánico total del suelo después de la recogida del cultivo (Figura VI.13, anexo-tabla 42). El aumento inducido por cada enmienda fue similar tanto en los suelos sin fertilizar (NF), como en los fertilizados con NPK (FQ) o inoculados con microorganismos simbioses (FB). Comparativamente, los niveles de COT fueron superiores, al final de experimento, en el suelo que había sido enmendado con el alperujo (SAPE) que tenía un menor contenido en materia orgánica (alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y *E. foetida* Tabla VI.2). Ello puso de manifiesto un diferente grado de mineralización de los diferentes alperujos incorporados al suelo. En base a los valores teóricos de carbono orgánico total en el suelo establecidos al inicio del experimento ($S= 8,9 \text{ g kg}^{-1}$, $SA= 16,91 \text{ g kg}^{-1}$, $SAP: 15,18 \text{ g kg}^{-1}$, $SAE: 14, 24 \text{ g kg}^{-1}$ y $SAPE: 12,69 \text{ g kg}^{-1}$), y teniendo en cuenta la mineralización de la propia materia orgánica contenida en el suelo natural, se pudo estimar que la mineralización, durante el desarrollo del cultivo, de la materia orgánica incorporada por cada una de las enmiendas oleícolas adicionales fue la siguiente: Alperujo natural: 42-62%, media: 54%; Alperujo degradado con *P.ostreatus*= 56-64%, media: 60%; Alperujo degradado por *E. foetida*= 28-44%, media: 39% y Alperujo degradado por *P. ostreatus* y *E. foetida*= inapreciable.

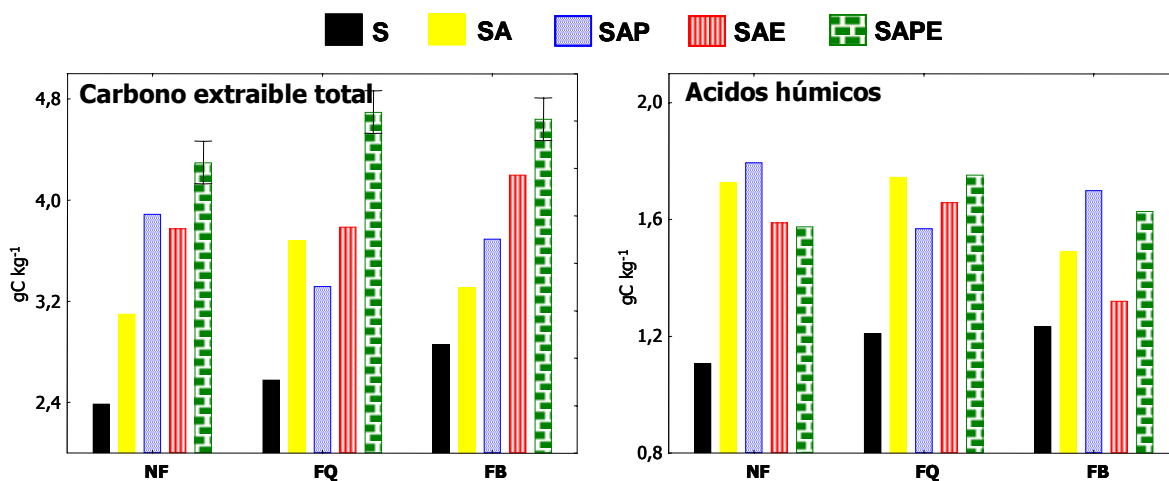


Figura VI.14. Carbono extraíble total (COT) y ácidos húmicos (AH) en el suelo poscosecha en los diferentes tratamientos ensayados. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: COT, anexo, tabla 43; AH, Anexo, tabla 44)

El carbono de las sustancias húmicas corresponde a las fracciones extraídas con soluciones alcalinas (en nuestro estudio pirofosfato sódico, pH 7,1) e incluyen a los ácidos húmicos y fúlvicos. Aunque el alperujo natural, presentaba, analíticamente, un mayor contenido de carbono extraíble y ácidos húmicos que los alperujos biodegradados (tabla VI.1), su aplicación al suelo, provocó, después de la recogida del cultivo de alfalfa, aumentos menos acusados de esas fracciones orgánicas que los transformados por *P. ostreatus* o/y *E. foetida* (Figura VI.14, anexo-tablas 43 y 44). Ese efecto aconteció tanto en el suelo sin fertilizar (NF) como fertilizado químicamente (FQ) o inoculado con

rizobios y micorrizas (FB). Entre los alperujos biodegradados, aquel biotransformado por *P. ostreatus* y *E. foetida* (SAPE) presentaron valores más elevados de CET y AH que los descompuestos individualmente por esos organismos (SAP y SAE). En el tratamiento SAPE los aumentos, globales, de las sustancias húmicas extraídas fueron de un 74% y de los ácidos húmicos de un 28% respecto al suelo sin enmendar (S). Al igual que lo observado con el carbono orgánico total, la fertilización del suelo con NPK o su inoculación con microorganismos simbióticos tuvo un escaso efecto sobre las fracciones humificadas del suelo.

Es un hecho constatado que el uso de insumos orgánicos constituye una herramienta eficaz para aumentar los niveles de materia orgánica total y humificada de los suelos agrícolas. Con ello se incrementa la fertilidad y calidad física, química, biológica y biológica de los suelos, se reduce su degradación y se favorece el secuestro de carbono, que ayuda a mitigar el efecto invernadero (Paustian y col., 1997; Lal, 2004). En nuestro estudio, los diferentes tipos de alperujos incorporados al suelo se mostraron eficaces para incrementar los niveles de carbono orgánico del suelo, aunque comparativamente ese incremento fue mayor, especialmente en la fracción orgánica más humificada, cuando se aplicaron alperujos biodegradados previamente por *P. ostreatus* o/y *E. foetida*. Esas diferencias habría que atribuir las a que el alperujo natural, aunque contiene mayores niveles de carbono orgánico total (COT) y extraíble (CET) que los biodegradados, presenta una materia orgánica inestable y fácilmente mineralizable, y las fracciones orgánicas aportadas por este residuo no son verdaderas sustancias húmicas, si no que estarían formadas por compuestos orgánicos lábiles, que son degradados por la microbiota del suelo (Tate, 1987; García y col., 1992). La degradación de estas sustancias durante los procesos de biotransformación a los que fue, previamente, sometido el alperujo (capítulos II, III y IV de esta Memoria de tesis doctoral) dio lugar a productos finales con una materia orgánica más estable y madura, que una vez incorporados al suelo inducirían un mayor aumento de las fracciones orgánicas más humificadas de este medio (Senesi, 1989). En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la efectividad de los diferentes alperujos ensayados para aumentar las fracciones orgánicas del suelo, teniendo en cuenta además su mineralización durante el desarrollo del cultivo de alfalfa, sería la siguiente: APE>AE>AP>A.

VI.2.10. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN SUELO POSTCOSECHA

Las deshidrogenasas son fundamentales en los sistemas enzimáticos de los microorganismos y juegan un papel importante en las primeras etapas de oxidación de la materia orgánica del suelo, transfiriendo electrones o hidrógeno de los sustratos a los aceptores (García-Gil, 2001). La actividad de este enzima sirve como indicador de los sistemas redox microbianos de los suelos y son consideradas como una buena medida de la actividad oxidativa de la biomasa (Tabatabai, 1994), correlacionándose con la biomasa microbiana y respiración basal del suelo (García y Hernández, 1997).

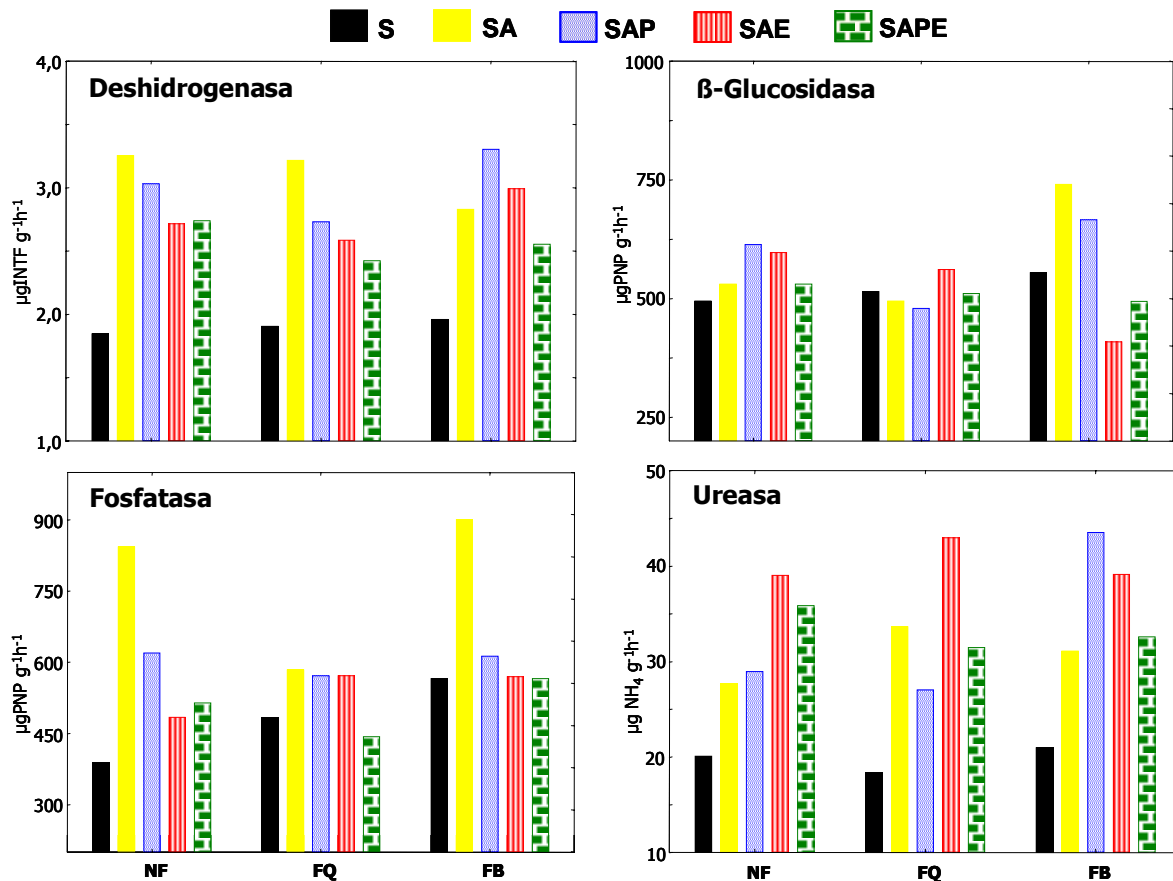


Figura VI.15. Actividades enzimáticas suelo después de la recogida del cultivo. Valores medios de tres repeticiones. (ANOVA y contrastes post hoc: deshidrogenasa, Anexo, tabla 45; β -glucosidasa, Anexo, tabla 46; fosfatasa, anexo, tabla 47; ureasa, anexo, tabla 48)

La aplicación de las diferentes enmiendas oleícolas aumentó significativamente la actividad deshidrogenasa del suelo después de la recogida del cultivo de alfalfa, mientras que la adición de NPK (FQ) o la inoculación con microorganismos simbióticos (FB) tuvo poco efecto, globalmente, sobre esa actividad (Figura VI.15, anexo-tabla 45). Los aumentos registrados de esta actividad, en todos los suelos enmendados orgánicamente, confirman lo observado por otros autores (Benítez y col., 2000a; Ceccanti y García 1994; Masciandaro y col., 2000; Romero y col., 2005) y serían atribuidos a un aumento de biomasa microbiana en esos suelos, debido, por una parte, a la incorporación de microorganismos y enzimas a través de las enmiendas aplicadas y, por otra, a la adición de sustratos orgánicos fácilmente biodegradables que promoverían el crecimiento de los microorganismos propios de suelo enmendado (García y col., 1994; Benítez y col., 1999). Aunque, comparativamente no se apreciaron diferencias muy acusadas entre los diferentes tipos de alperujos aplicados, la incorporación del natural (SA) promovió mayor actividad deshidrogenasa en el suelo que los biodegradados (SAP, SAE y SAPE). Estos resultados serían lógicos, ya que esta enmienda fue la que incorporaría al suelo una mayor cantidad de sustancias orgánicas fácilmente metabolizables (Carbono hidrosoluble: 148 gC kg^{-1}). Sin embargo, el alperujo natural también contiene compuestos solubles tóxicos, como los polifenoles, que pueden inhibir la actividad deshidrogenasa (Benítez y col., 2004), ya que esos

compuestos tienen una fuerte actividad antimicrobiana (Capasso y col., 1995; González y col., 1990). Sin embargo, la degradación de estos compuestos tóxicos durante la mineralización del alperujo en el suelo reduciría drásticamente el posible efecto inhibitorio de ellos sobre la actividad deshidrogenasa.

La actividad β -Glucosidasa puede reflejar los cambios que se producen sobre las fracciones orgánicas añadidas con las enmiendas orgánicas, siendo una enzima involucrada en el ciclo del carbono (García y col., 1994). En general, esta actividad se encontró, después de la recogida del cultivo de alfalfa poco afectada por la aplicación de los diferentes tipos de alperujos (A, AP, AE y APE), los fertilizantes químicos (FQ) e incluso los inóculos de *Sinorhizobium* y micorrizas (FB) (Figura VI.15, anexo-tabla 46). Los mayores aumentos únicamente fueron más apreciables cuando el suelo inoculado (FB) había sido enmendado con los alperujos menos biodegradados (SA y SAP). Esta escasa variabilidad contrasta con lo apreciado en otros estudios acerca del aumento de la actividad β -Glucosidasa en suelos enmendados (Benítez y col., 1999, García-Gil y col., 2000).

La medida de la fosfatasa en suelos refleja la actividad de las enzimas unidas a los coloides y sustancias húmicas, las enzimas libres en la solución del suelo y las fosfatasas asociadas a los restos vegetales y microorganismos metabólicamente activos (Nannipieri y col., 1990). La medida de la actividad fosfatasa puede ser un buen indicador de la mineralización potencial del fósforo orgánico de los suelos (Dick y Tabatabai, 1993). La incorporación de las diferentes enmiendas oleícolas ensayadas aumentó significativamente los valores de la actividad fosfatasa en el suelo después de la recogida del cultivo (Figura VI.15, anexo-tabla 47). Estos aumentos concuerdan con los observados en otros estudios (Benítez, 2000a; García-Gil y col., 2000; Marcote y col., 1998; Perucci, 1992) y se relacionarían tanto con la estimulación de la actividad microbiana del suelo inducida por el aporte de la enmienda orgánica como por el aporte de esa enzima por la propia enmienda. Comparativamente, los tratamientos que incluían alperujo natural (SA) presentaron mayores actividades fosfatasas en el suelo que los que contenían alperujos biodegradados (SAP, SAE y SAPE). La aplicación de P mineral al suelo (FQ) disminuyó la actividad fosfatasa en la mayoría de los suelos enmendados orgánicamente, siendo esta disminución muy acusada en el tratamiento que incluía alperujo natural. En cambio la inoculación del suelo con micorrizas se mostró como una herramienta eficaz para aumentar la actividad fosfatasa tanto en el suelo sin enmendar como en los suelos enmendados con los diferentes tipos de alperujos.

La enzima ureasa está ligada al ciclo del nitrógeno y a los procesos que acontecen en los suelos que han recibido algún tipo de fertilización nitrogenada mineral u orgánica. Al igual que lo observado en las otras actividades enzimáticas, la actividad ureasa se encontró potenciada cuando el suelo fue enmendado con los cuatro tipos de alperujos ensayados (Tabla VI.15, anexo-tabla 48). Las mayores actividades se registraron en el suelo enmendados con alperujo biodegradado con *P. ostreatus*, sólo o en conjuntamente con *E. foetida* (SAP y SAPE), enmiendas que presentaban, los mayores niveles de esa actividad (Tabla VI.1). Ello explicaría en parte los aumentos registrados en esos tratamientos. La aplicación de NPK al suelo no tuvo efecto apreciable, mientras tonel binomio rhizobio-micorriza aumentó en la mayoría de los tratamientos que contenían alperujo, la actividad ureasa del suelo poscosecha.

CONCLUSIONES

Respecto a los procesos de biodegradación de alperujo inducidos por *Pleurotus ostreatus* o/y *Eisenia foetida*

1. El alperujo es un residuo oleícola lignocelulósico, recalcitrante, con un elevado contenido en polifenoles que le confieren una acusada fitotoxicidad. *Pleurotus ostreatus* fue capaz de degradar los polifenoles presentes en el alperujo mediante la acción de exoenzimas oxidoreductasas (lacasa, manganeso peroxidasa).

2. La biodegradación de este residuo oleícola inducida por *P. ostreatus* estuvo favorecida cuando el alperujo se mezcló con paja a una relación 2:1 ps.ps. La biodegradación en esta mezcla siguió una evolución similar a la de la paja, sustrato utilizado para la explotación comercial de *Pleurotus*.

3. La acción de *Eisenia foetida* redujo de forma similar los niveles de polifenoles del alperujo natural, debido, fundamentalmente, al mantenimiento de las condiciones aerobias que favorecieron la oxidación de esos compuestos orgánicos.

4. Comparativamente, la acción de las lombrices aceleró la biodegradación del alperujo. Como consecuencia de ello, el producto final presentó una mayor estabilidad y madurez que el biodegradado con hongos.

5. La acción sucesiva de *P. ostreatus* y *E. foetida* se mostró como el proceso más efectivo para biodegradar el alperujo natural. El producto final obtenido presentó una óptima relación C/N, nula fitotoxicidad y, por lo general, mayor contenido en nutrientes que aquellos obtenidos por la acción individual de hongos o lombrices.

6. Los análisis periódicos de ciertas actividades enzimáticas (deshidrogenasa e hidrolasas) pueden constituir herramientas biotecnológicas eficaces para monitorizar los procesos de biodegradación de alperujos. En general esas actividades enzimáticas tendieron a aumentar por la biodegradación de ese residuo oleícola por *P. ostreatus* o/y *E. foetida*.

Respecto a la utilización agrícola del alperujo natural o biodegradado por *Pleurotus ostreatus* o/y *Eisenia foetida*

1. La aplicación de alperujo natural al suelo redujo acusadamente los rendimientos del cultivo de alfalfa ensayado, inhibiendo la captación de nutrientes por las plantas. Por ello, su aplicación directa al suelo con fines agrícolas debería estar prohibida.

2. El uso de alperujo biodegradado como enmienda del suelo provocó un aumento significativo de los rendimientos de cosecha de un cultivo de alfalfa. Además favoreció la nutrición nitrogenada, fosforada y potásica del cultivo y aumentó la actividad biológica y los niveles de materia orgánica humificada del suelo.
3. En general, el alperujo biodegradado por *P. ostreatus* y, posteriormente, por *E. foetida* se mostró mas efectivo, agronómicamente, que el biodegradado por esos descomponedores individualmente. Ello aconteció tanto simulando una agricultura convencional como biológica.
4. Comparativamente, en los suelos enmendados de forma orgánica, el aporte de insumos de una típica fertilización química (NPK) no modificó significativamente respecto a la inoculación con rizobios y micorrizas las propiedades químicas, bioquímicas y biológicas estudiadas en planta y suelo

*Como conclusión final e integradora de las precedentes, se postula la biodegradación por *P. ostreatus* y, posteriormente, por *E. foetida* como proceso de reciclado del alperujo generado durante la extracción del aceite de oliva mediante centrifugación por dos fases. Este proceso biotecnológico, que debe ser optimizado a una escala mayor, tiene un bajo coste económico y permite la valorización del alperujo como enmienda orgánica del suelo.*

BIBLIOGRAFIA

- Adriano D. C. (1986).** Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer-Verlag, New York.
- Aggelis G., Ehaliotis C., Nerud F., Stoychev I., Lyberatos G. y Zervakis G. (2002).** Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:353–60.
- Aggelis GG, Iconomou D, Christou M, Bokas D, Kotzailias S, Christou G, Tsagou V y Papanikolaou S. (2003).** Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res.* 37: 3897–3904.
- Aira, M., Monroy, F., Dominguez, J., Mato, S. (2002).** How earthworm density affects microbial biomass and activity in pig manure. *European J. Soil Biol.*, 38:7-10.
- Alba J, Ruiz M.A, Hidalgo F, Martinez F, Moyano M.J. (1993).** "Procesos de elaboración: Nuevas técnicas de extracción". *Dossier Oleo*, 2, 40-59.
- Alba J. (1994).** "Nuevas tecnologías para la obtención del aceite de oliva". *Fruticultura Profesional (Suplemento)*, 62:85-95.
- Albanell, E., Plaxats, J. y Cabrero, T. (1988).** Chemical changes during vermicomposting of sheep manure mixed with cotton industrial wastes. *Biol. Fert. Soils*, 6, 266-269.
- Alburquerque, J.A., Gonzalez, J., Garcia, D., Cegarra, J. (2004).** Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biores, Technol.*, 91, 195-200.
- Alef, K, Nannipieri, P y Trasar-Cepeda C. (1995).** Phosphatase activity. En: K. Alef and P. Nannipieri (Eds), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, London, pp. 335–344.
- Alef, K. (1995).** Dehydrogenase activity. pp 228-231. *In:* K.Alef y P.Nannipieri (eds). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers. London. England
- Alexander M. (1980).** "Introducción a la microbiología del suelo". México, AGT Editor 1980, pp. 163-218, 270-291.
- Alexopoulos CJ y Mims CW. (1987).** "Introducción a la micología". Editorial Omega. Barcelona. 631 pp.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, y Blackwell M. (1996).** "Introductory Mycology". Fourth Edition. John Wiley & Sons. Inc. 869 pp.
- Aliotta, G., Cafiero, G., De Feo, V., Di Blasio B., Iacovino R., Oliva A. (2000).** Allelochemicals from. Rue (*Ruta graveolens* L.) and olive (*Olea europea* L.) oil mill waste as potential natural pesticides. *Current Topics in Phytochemistry* 3:167-177
- Amhajji A., El-jalil M. H., Faid M., Vasel J. L., El-yachioui M. (2000).** Polyphenol removal from olive mill waste waters by selected mould strains. *Grasas y aceites (Grasas aceites)* vol. 51 (6), 400-404.
- AOAC (1984).** Official methods of analysis. 14th edition. Williams, S. (Ed), 40 pp. association of official analytical chemists. Arlington, VI.

- Aparicio R y Harwood J. (2003).** "Manual del Aceite de Oliva". AMV-Mundiprensa, Madrid.
- Aragón J.M., Palancar M.C. (2000).** Informe final. IMPROLIVE 2000. Presente y futuro del alpeorujo. Mejora de los tratamientos y validación del residuo sólido-líquido de la extracción en dos fases del aceite de oliva. 251-268. Universidad Complutense Madrid. España.
- Área Metropolitana del Valle de Aburra. (2000).** "Hongos y musgos del Valle de Aburrá". Medellín (Colombia), Área Metropolitana del Valle de Aburrá. 153p.
- Artacho del Pino A. (1997).** Tratamiento del Alperujo. Una estrategia integral para los productos y residuos de almazara. Mesa redonda sobre el Orujo de Almazara. VIII Symposium Científico-Técnico. EXPOLIVA 97. Jaén.
- Atiyeh, R.A., Domínguez, J., Subler, S., y Edwards, C.A. (2000).** Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiol.* 44:709-724.
- Azcón-Aguilar R., Barea J. (1997).** Mycorrhizal dependency of a representative plant species in Mediterranean shrublands (*Lavandulaspica* L.) as a key factor to its use for revegetation strategies in desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecology* 7: 83-92.
- Azcón-Bieto J, y Talón M. (2000).** "Fundamentos de fisiología vegetal", Ed. McGraw-Hill-Interamericana, 2000, 261-283.
- Baca M.T., Benítez E., and Nogales R. (1992).** Effect of addition of different sugarcane bagasse composts on sequential micronutrients assimilability in ryegrass. *Waste Management & Research*, 10, 13-19.
- Baethgen W.E. y Alley M.M. (1989).** A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldahl digests. *Communication Soil Science and Plant Analysis*, 20, 961-969.
- Bansal, S., Kapoor, K.K. (2000).** Vermicomposting of crop residues and cattle dung with *Eisenia foetida*. *Bioresource Technology*, 73, 95-98
- Barranco D, Rallo L, Uceda M y Hermoso M. (1994).** "Fichas varietales del olivo". Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba y Departamento de Olivicultura de la Finca "Venta del LLano" en Mengibar (Jaén).
- Barranco D, Fernández-Escobar R y Rallo L. (2004).** "El cultivo del olivo". 3ª ed. rev. y amp. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Mundi-Prensa. Sevilla.
- Belitz y Grosch. (1988).** "Química de los alimentos". Ed. Acribia España: Zaragoza.
- Belkacem S. y Nys C. (1995).** Consequences of liming and gypsum top-dressing on nitrogen and carbon dynamics in acid forest soils with different humus forms. *Plant Soil* 173, 79-88
- Bending G., Friloux M., y Walker A. (2002).** "Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential". *FEMS Microbiology Letters* 2002; 212: 59-63.
- Benfield, C.D., Howard, P.J. y Howard, D.M. (1977).** The estimation of dehydrogenase activity in soils. *Soil Biol. and Biochem.*, 6, 67-70.

- Benítez, E., Elvira, C., Gómez, M., Gallardo-Lara, F., Nogales, R. (1995).** Leachates from a vermicomposting process: A possible new liquid fertilizer?. En: Rodríguez-Barrueco, C. (Ed.). *Fertilizers and Environment*, pp. 323-325. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Benítez E. (1996).** Capacidad fertilizante y contaminante de lodos de depuradora generados en la provincia de Granada. Tesis doctoral de la Universidad de Granada.
- Benítez, E., Nogales, R. Elvira, C. Masciandaro, G. y Ceccanti, B. (1999).** Enzymes as indicators of the stabilization of sewage sludges composting by *Eisenia andrei*. *Biores. Technol.*, 67(3), 297-303.
- Benítez, E., Melgar, R., Saínez, H., Gómez, M. y Nogales, R. (2000).** Enzymes activities in rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum*, L) grown with olive cake mulches. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1829-1835.
- Benítez C, Gil J y González J. (2000).** "Influencia de la humedad en la evolución de parámetros químicos de un suelo tras la adición de alperujo". *Edafología*. Volumen 7-2. Mayo 2000. Pág. 215-220.
- Benítez, E. Nogales, R., Masciandaro, G., Ceccanti, B. (2000a).** Isolation by IEF of humic – urease complexes from earthworms processed sewage sludges, *Biol. Fert. Soils*, 31: 489-493.
- Benítez, E., Melgar, R., Sainz, H., Gómez, M., Nogales, R. (2000b).** Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum*, L.) grown with olive cake mulches. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1829-1835.
- Benítez, E., Romero, E. Gómez, M., Gallardo Lara, F. and Nogales, R., (2001).** Biosolids and biosolids ash as sources of trace elements in the plant soil system. *Water, Air, and Soil Pollution*, 132, 75-87.
- Benítez E., Saínez H., Melgar R. y Nogales. R. (2002).** Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: a pilot scale study. *Waste Management and Research.*, 20, 134-142.
- Benítez, E., Melgar, R., Nogales, R. (2004).** Estimating soil resilience to toxic waste by measuring enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.*, 36:1615-1623.
- Benítez, E.; Sainz, H.; Nogales, R. (2005).** Hydrolytic enzyme activities of extracted humic substances during the vermicomposting of a lignocellulosic olive waste. *Biores. Technol.* 96: 785–790.
- Beringer J.E. (1974).** R Factor Transfer in *Rhizobium-Leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84, 188-198.
- Beyer, L., Wackendorf, C., Elsner, D.C. y Knabe, R. (1993).** Suitability of dehydrogenase activity assay as an index of soil biological activity. *Biol. Fert. Soils*, 16, 52-56.
- BOE. (2005).** Real Decreto 824/2005 sobre productos fertilizantes. BOE num 171 del 19 de julio de 2005.
- Bolan N.S. & Abbott L.K. (1983).** Seasonal variation in infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to plant response to applied phosphorus. *Aust. J. Soil Res.* 21: 207-210.

- Bollag J.M., Shuttleworth K.L., and Anderson D.H. (1988).** "Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds". *Appl. Environ. Microbiol.* 1988; 53:3086 –91.
- Bolton Jr, H., Elliott, L.F., Papendick, R.I. y Bezdicek, D.F. (1985).** Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 297-302.
- Bonilla A, Murillo J.J., González J, y Sanz B. (1997).** "Variaciones de los ácidos grasos y otros parámetros de calidad de aceite de oliva virgen sometidos a proceso de refinado", *Nutr. Hosp.*1997, XII (6); 319-311.
- Borja R., Rincón B., Raposo F., Alba J., and Martín A. (2002).** A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature. *Process Biochemistry* 38, 733–742.
- Boskou D. (1998).** "Composición del aceite de oliva", en *Química y tecnología del aceite de oliva*, Boskou, D. (Ed.). AMV Ediciones, 1998, 67-103.
- Bouché, M.B. (1972)** Lombrices de France. Ecologie et systematique. *Annales Zoologie, Ecologie Animale*, 72 : 1-671.
- Boyd S.A., Sommers L.E. y Nelson D.W. (1980).** Changes in the humic acid fraction of soil resulting from sludge application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:1179-1186.
- Braschi I., Ciavatta C., Giovannini C., Gessa C. (2003).** Combined effect of water and organic matter on phosphorus availability in calcareous soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 67, 1.67-74
- Bravo L. (1998).** "Poliphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance". *Nutr Rev*; 56 (11): 317-333.
- Bunt, A.C. (1988).** *Media and mixes for container-grow plants.* (2^a edition). Unwin Hyman, London.
- Burns, R.G. (1982)** Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 423-427.
- Buswell J.A, and Odier E. (1987).** "Lignin biodegradation". *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v.6, n.1, p. 01-60.
- C.I.I. (1969).** Métodos de referencia para la determinación de elementos minerales en vegetales. I. N, P, K, Ca, Mg. *Anal. Edaf. Ahrobiol.* ,28, 409-430.
- Cadavid J y Cardona C. (1996).** "Evaluación y optimización técnico económica de las instalaciones de un cultivo de hongos (*Pleurotus ostreatus*) utilizando como sustrato pulpa de café". 75p. Tesis de grado (Ingeniero Agrícola). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agrícola.
- Calabresse G, (2002).** "Efectos del aceite de oliva virgen extra beneficiosos para la salud", *Olivae*, 2002, 93; 19-20.
- Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A. and Cristinzio G., (1995).** Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J Appl Bacteriol.* 79, 393-398.

- Cardona LF y Bedoya A. (1996).** "Producción de orellanas (*Pleurotus ostreatus*), deshidratadas y condimentadas". 88p.: il. Trabajo de grado M.Sc. (Ciencia y Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Carrillo L. 2003.** "Microbiología Agrícola". Universidad Nacional de Salta, Argentina. ISBN 987-9381-16-5.
- Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G. y Lo Cascio B. 2003.** Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 50:959–966.
- Casalicchio, G. y Graziano, P.L. (1987).** A comparison of the chemical properties of compost and wormcasting from municipal waste and sewage sludge. Pagliai, A.M. y Omodeo, P. (Eds). En *Earthworms. Select Symposia and Monographs U.Z.I.*, Modena, Italia. pp 437-457.
- Ceccanti B. & García C. (1994).** Coupled chemical and biochemical methodologies to characterize a composting process and the humic substances. Senesi, N. y Miano, T.M. (Eds). En: *Humic substances in the global environment and implications on human health*. Amsterdam: Elsevier. pp. 1279-1284.
- Ceccanti, B. García, C. Nogales, R. Benítez, E. y Masciandaro, G. (1997).** Attività e ruolo delle sostanze umiche nell'ambiente: Aspetti chimico-strutturali e biochimici. En: *Dal suolo alla pianta dalla pianta al suolo. Le sostanze umiche come base della sostenibilità*. Proc II Convegno Nazionale del Capitolo Italiano dell'IHSS, pp 1-9.
- Cegarra, J.; Alburquerque, J.A.; González, J. y García, D. (2000).** Fertilización orgánica: Compostaje de subproductos del olivar. Ponencia presentada en las Jornadas de ECOLIVA 2000. Jaén.
- Chefetz B., Kerem Z., Chen Y., and Hadar Y. (1998).** Isolation and partial characterization of laccase from a thermophilic composted municipal solid waste. *Soil.Biol.Biochem.* Vol.30, Nº 8/9. pp. 1091-1098, 1998.
- Chesson A., Russell W.R. y Provan G.J. (1997).** "Metabolites of the phenylpropanoid pathway - common origin, common properties" In: *Polyphenols in foods. Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop 1997, Aberdeen, Scotland 1997*: 17-23.
- Childs R. E., and Bardsley W. G. 1975.** The steady-state kinetics of peroxidase with 2,29-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as a chromagen. *Biochem. J.* 145:93–103.
- Chung K-T., Wong T-Y., Wei C-I., Huang Y-W. y Lin Y. (1998).** Tannins and Human Health: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* : 1998; 38 (6): 421-464.
- Ciavatta C., Govi M., Pasoti L. y Sequi P. (1993).** Changes in organic matter during stabilization of compost from municipal solid wastes. *Biores. Technol.* 42:141-145.
- Clifford, M. N. and Ramírez Martínez, J. R. (1991).** Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chem.* 40: 35-42, 1991.
- Crecchio C., Ruggiero P., and Pizzigallo M.D.R. (1995).** "Poliphenoloxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds". *Biotechnol Bioengin* 1995; 48: 585-591.

- Curl, E.A. and B. Truelove. (1986).** The rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin. 288p.
- Curtis H. (1991).** "Biología". Ed. Médica Panamericana, Sao Paulo, Brasil.
- Das N., Sengupta S., and Mukherjee M. (1997).** "Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*". Appl Environ Microbiol 1997; 63: 4120-4122.
- Datar M.T., Rao M.N., Reddy, S. (1997).** Vermicomposting. A technological option for solid waste management. J. Solid Waste Technol. Mgt. 24 (2), 89±93.
- Davis S. y Burns R.G. (1990).** Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:721-726.
- De Felipe Anton M^a.R. (2004).** Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. An. R. Acad. Nac. Farm., 2004, 70: 743-776.
- Dec J., and Bollag J.M. (1990).** "Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions". Arch Environ Contam Toxicol 1990;19:543-50.
- Delmas J. (1989).** "Les champignons et leur culture. Culture actuelle et potentielle des champignons supérieurs". La Maison Rustique. Paris.
- Diario Oficial CEE. (1991).** Reglamento n.º 2568/91/CEE. Sept. 1991.
- Díaz-Burgos M.A., Ceccanti B., and Polo A. (1992).** Monitoring biochemical activity during sewage sludge composting. Biol. Fert. Soil 16, 145-150.
- Dick W.A. y Tabatabai M.A. (1993).** Significance and potential uses of soil enzymes. Metting, F.B. (Ed). En: Soil Microbial Ecology Application in Agricultural and Environment Management. Marcel Dekker, New York, pp. 95-125.
- Dick, W.A. y Tabatabai, M.A. (1993).** Significance and potential uses of soil enzymes. Metting, F.B. (Ed). En: *Soil Microbial Ecology Application in Agricultural and Environment Management*. Marcel Dekker, New York, pp. 95-125.
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1984).** Kinetic parameters of phosphatases in soils and organic waste materials. Soil Science 137, 7-15.
- Dighton, J. 1983.** Phosphatase production by mycorrhizal fungi. Plant Soil. 71: 455-462.
- Dinkelaker, B. y H. Marschner. (1992).** *In vivo* demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. Plant Soil 144: 199-205.
- Domínguez, J. (1996).** Estudio y comparación de los procesos de compostaje y vermicompostaje. Aplicación práctica al tratamiento de purines de cerdo. Tesis Doctoral de la Universidad de Vigo.
- Domínguez, J. (2004).** State of the art and new perspectives on vermicomposting research. En: Edwards, C.A. (Ed.). *Earthworm Ecology*, second edition. pp. 401-424. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Domínguez, J., Edwards, C.A. (1997).** Effects of stocking rate and moisture content on the growth and maturation of *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in pig manure. Soil Biol. Biochem., 29: 743-746.
- Domínguez, J., Edwards, C.A., Webster, M. (2000).** Vermicomposting of sewage sludge: Effect of bulking materials on the growth and reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. Pedobiol., 44: 24-32.

- Domínguez, J., Velando, A., Aira, M., Monroy, F. (2003a).** Uniparental reproduction of *Eisenia fetida* and *E. Andrei* (Oligochaeta: Lumbricidae): Evidence of selfinsemination. *Pedobiol.*, 47: 530–534.
- Domínguez, J., Parmelee, R.W., Edwards, C.A. (2003b).** Interactions between *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and nematode populations during vermicomposting. *Pedobiol.* 47:53-60.
- Domínguez, J., Velando, A., Ferreira, A. (2005).** Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species. *Pedobiol.*, 49: 81-87.
- Dommergues Y, Mangenot F. (1970).** *Écologie microbienne du sol.* Paris. Masson et Cie. 1970, pp 92-154.
- Drake, H.L., Schramm, A., Horn, M. (2006).** Earthworm gut microbial biomes: their importance to soil microorganisms, denitrification, and the terrestrial production of the greenhouse gas N₂O. En: König, H, Varma, A.(Eds.). *Intestinal Microorganisms of Termites and other Invertebrates.* pp. 65-87. Springer Verlag. New York.
- Eastman, B.R. (1999).** Achieving pathogen stabilization using vermicomposting. *Biocycle*, 40:62-64.
- Edwards, C.A. y Lofty, J.R. (1972).** *Biology of earthworms.* Chapman and Hall, London.333 p.
- Edwards C.A., and Fletcher K.E. (1988).** Interactions between earthworms and microorganisms in organic matter breakdown. *Agric. Ecosyst. Environ.* 24, 235–247.
- Edwards, C.A. (1988).** Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. En: Edwards, C.A. Neuhauser, E.F. (Eds). *Earthworms in waste and environment management.* Pp. 21-31 SPB Academic Publishing BV, The Hague, Netherland.
- Edwards, C.A. y Burrows, I. (1988).** The potential of earthworms compost as plant growth media. En Edwards C.A. y Neuhauser E.F. (Eds). En: *Earthworms in waste and environmental management.* SPB Academic Publishing BV, The Hague. p. 211-221.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J. (1996).** *Biology and Ecology of Earthworms.* Chapman and Hill, London.
- Eggen T. (2000).** " Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi". Doctor Scientiarum Theses. Jordforsk, Norway. Agricultural University of Norway, 2000.
- Eivazi F., Zakaria A. (1993).** "β-glucosidase activity in soils amend with sewage sludge". *Ecosystem and Environment*, 43:155-161.
- Eivazi, F. y Tabatabai, MA (1977).** Phosphatases in Soils *Soil Biology and Biochemistry* 9 (3) 167-172
- Ellis B.G. and Knezek B.D. (1972).** Adsorption Reactions of Micronutrients in Soils, in J. J. Mortvedt, P. M. Giordano and W. L. Lindsay (eds.), *Micronutrients in Agriculture*, SSSA, Madison, Wis, p. 59.
- Elvira C. (1993).** Vermicompostaje de reiduos orgánicos. Su aplicación a lodos generados por la industria papelera. Tesis Doctoral de la Universidad de Santiago de Compostela. 289 p.
- Elvira C., Mato S., Nogales R. (1995).** Changes in heavy metal extractability and organic matter fractions after vermicomposting of sludges from a paper industry and wastewater treatment plant. *Fresenius Environ. Bull.* 4: 503-507.

- Elvira C., Domínguez J., Briones M.J. (1996a).** Growth and reproduction of *Eisenia andrei* and *E. fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in different organic residues. *Pedobiol.* 40: 377–384.
- Elvira C., Goicoechea M., Sampedro L., Mato S., Nogales R. (1996b).** Bioconversion of solid paper pulp mill sludge by earthworms. *Biores. Technol.* 57: 173-177.
- Elvira C., Sanpedro L., Domínguez J., Mato S. (1997).** Vermicomposting of wastewater sludge from paper-pulp industry with nitrogen rich materials. *Soil Biol. Biochem.* 29: 759-762.
- Elvira C., Sampedro L., Benítez E. y Nogales R. (1998).** Vermicomposting of sludges from paper mill and dairy industries with *Eisenia andrei*: A pilot scale study. *Biores. Technol.*, 63, 211-218.
- Elvira C., Sampedro L., Nogales R. (1999).** Suitability of sludges from dairy and paper industries for growth and reproduction of *Eisenia andrei*. *Pedobiol.* 43(6): 766-770.
- Enari T.M. y Niku-Paavola M.L. (1987)** *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 5, 67-87
- Engelstad F. (1991).** Impact of earthworms on decomposition of garden refuse. *Biol. Fert. Soils*, 12, 137-140.
- Entrala A. (1998).** "Dieta y aterogénesis: tipos de alimentos que influyen en los fenómenos de arteriosclerosis", II Jornadas de Nutrición Práctica, Revista de Nutrición Práctica, 1998, 2: 77-84.
- Erich M.S., Fitzgerald C.B., and Porter G.A. (2002).** The effect of organic amendments on phosphorus chemistry in a potato cropping system *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88, 79–88.
- Eriksson K-El., Blanchette R.A., Ander P. (1990).** Microbial and enzymatic degradation of wood components. Springer-Verlag, Berlin.
- Escarpa A., González M.C. (2001).** An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 57–139.
- Espínola F., y Moya A.J. (1995).** "Simulación del decantador centrífugo en la extracción del aceite de oliva virgen", VII Simposio Andaluz del Alimento, Jaén 1995.
- Espuny A. (1997).** "Subproductos y Residuos de almazara". Una estrategia integral para los subproductos y residuos de almazara. Mesa Redonda sobre el Orujo de Almazara. VIII Symposium Científico-Técnico. EXPOLIVA 97. Jaén.
- Fageria N.K., Baligar V.C., and Clark R.B. (2002).** Micronutrientes in crop production. *Advances in Agronomy*, 77, 185-268.
- FEDNA. (2003).** "Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de compuestos". 2ª Edición. C.de Blas. G.G. Mateos y P.Gª. Rebollar (eds). Fundación Española para el Desarrollo de Nutrición Animal. Madrid. España. 423pp.
- Felizón B., Fernández-Bolaños J., Heredia A., Guillén R. (2000).** Steam-explosion pretreatment of olive cake. *Journal of the American Oil Chemists Society* 77, 15–22.
- Fernández-Bayo J., Nogales R., Romero E. (2006).** Improvement of Imidacloprid (Confidor®) in soils by adding vermicompost from spent grape marc. *Sci. Total. Environ.* En prensa
- Fleming T.P., Richards K.S. (1982).** Localization of adsorbed heavy metals on the earthworm body surface and their retrieval by chelation. *Pedobiol.*, 23: 415-418.

- Fox T.R. y Cormfield N.B. (1990).** Low molecular weight organic acid in selected forest soils of the south-eastern USA. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 54:1763–1767.
- France A. (2002).** "Producción de hongos comestibles". *Boletín INIA* 2002 N° 23.
- France A., y Cañumir J.A. (2002).** "El cultivo del hongo ostra". Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Quilamapu), Gobierno de Chile.
- Galiano F. & Rodríguez E. (1963).** Fertilizantes orgánicos de basura de ciudad aplicados en horticultura. *Tecnología*, 5(24), 15-23.
- Gallardo-Lara F. y Nogales R. (1987).** Effect of the application of town refuse compost on the soil-plant system: *A review. Biological Wastes*, 19, 35-62.
- Gallardo-Lara F., Quesada J.L., Azcón M. and Pérez J.D. (1995).** Dynamics of potassium fractions in the soil-plant system after the application of an acid potassium-rich effluent. *Toxicol. and Environ. Chem.*, 48, 49-57.
- García C., Hernández T., Costa F., Ceccanti B. and Ciardi C. (1992).** Changes in ATP content, enzyme activity and inorganic nitrogen species during composting of organic wastes. *Can. J. Soil Sci.*, 72, 243-253.
- García C., Hernández T., Costa F., Ceccanti B. y Ganni A. (1993).** Hydrolases in the organic matter fractions of sewage sludge: changes with composting. *Biores. Technol.*, 45, 47-52.
- García C., Hernández T., and Costa F. (1994).** Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology Biochemistry*, 26, 1185-1191.
- García C., Hernández T., Costa F., y Ceccanti B. (1994).** "Biochemical parameters in soils regenerated by the addition of organic wastes". *Waste Management and Research*, 12:457-466.
- García C. & Hernández T. (1997).** Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biol. Biochem.*, 29(2), 171-177.
- García, C., Hernández, M.T. y Costa, F. (1997).** Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communication Soil Science and Plant Analysis*, 28, 123-134.
- García-Gil J.A., Plaza C., Soler-Rovira P., and Polo A. (2000).** Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 197-1913.
- García-Gil J.C. (2001).** Efectos residuales y acumulativos producidos por la aplicación de compost de residuos urbanos y lodos de depuradora sobre agrosistemas mediterráneos degradados. Tesis doctoral de la Universidad Autónoma de Madrid.
- García-Gómez A., Bernal M. P., Roig A. (2005).** Organic matter fractions involved in degradation and humification processes during composting. *Compost science & utilization* 13 (2), 127-135
- Giannoutsou, E., Lambraki, M. y Karagouni, A.D. (1997).** Chemical and microbial characterization of olive oil waste by the two-phase extraction technique. Proceedings of "The eleventh Forum for Applied Biotechnology", September 25-26, Gent, Belgium.
- Ginterova A. and Maxianova A. (1975).** The balance of nitrogen and composition of proteins in *Pleurotus ostreatus* grown on natural substrates. *Folia Microbiol.* 20:246-250.

- Goering H., and Van Soest P. (1970).** Forage ceber analysis (apparatus reagents procedure and some applications). In USDA Agriculture Handbook. Washington, DC: USDA-ARS. pp. 1-12
- González M.D., Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A. (1990).** Studies of antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechin). Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, 20, 423-432.
- Gresshoff P.M. (1993).** *Plant Breeding Rev.*, 11: 275-318 (1993).
- Gutiérrez F., Jiménez B., Ruiz A., y Albi M.A. (1999).** "Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved", *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:121-127.
- Guzmán G., y Mata G., (1993).** "El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales".. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Hadas A., Agassi M., Zhevelev H., Kautsky L., Levy G.J., Fizik E., and Gotesman M. (2004).** Mulching with composted municipal solid wastes in the Central Negev, Israel. II. Effect on available nitrogen and phosphorus and on organic matter in soil. *Soil & Tillage Research* 78 (2004) 115–128.
- Harborne J.B. (1989).** "General procedures and measurements of total phenolics". In: Harborne J .B. Ed. *Plant Phenolics*, vol 1, from "Methods in Plant Biochemistry Series": Academic Press, London. 1989:1-28.
- Harborne J.B. (1993).** *The flavonoids: Advances in Research Since 1986.* Chapman y Hall Ed., London.
- Harley J.L., & Smith S.E. (1983).** *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press, Londres. 483 pp.
- Hartenstein, R. y Hartenstein, F. (1981).** Physicochemical changes effected in activated sludge by the earthworm *Eisenia foetida*. *J. Environ. Qual.*, 10(3), 377-382.
- Hattori H. (1988).** "Microbial activity in soil amended with sewage sludge". *Soil. Science and Plant Nutrition*, 34: 221-232.
- Hayano K., Katami A. (1977).** "Extraction of b-glucosidades activity in soil". *Soil Biology and Biochemistry*, 9:349-351.
- Hayano K., Tubaki K. (1985).** "Origen and properties of β -glucosidades activity of tomato-field soil". *Soil Biology and Biochemistry*, 17:553-557.
- Hayes, M.B.H. (1986).** Soil organic matter extraction, fractionation and effects on soil structure. Chen, Y. y Avnimelech, Y. (Eds). En *the Role of Organic Matter in Modern Agriculture.* Bostonm MA: Martinus Nijhoff. pp. 183-208.
- Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P., and Anke T. (1998).** Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family *Coprinaceae*). *Appl Environ Microbiol*, May 1998, Vol. 64, No. 5: p. 1601-1606.
- Hermoso M., Uceda, M., García-Ortiz, A., Jiménez, A., Beltrán, G. (1999).** "Second centrifugation of olive paste. Oil recuperation percent and olive oil characterization". *Acta Horticulturae* 474, 721-724.

- Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Van de Putte B. (1993).** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem.* 1993;41:1242-1246.
- Hervas L., Mazuelos C., Senesi N. and Saiz-Jimenez C. (1989).** Chemical and physico-chemical characterization of vermicomposts and their humic acid fractions. *The Science of the Total Environment* 81/82 (1989), pp. 543–550.
- Hibbett DS, Binder M. Evolution of marine mushrooms. (2001).** *Biol Bull.* 2001 Dec;201(3):319-22.
- Higson FK. (1991).** "Degradation of xenobiotics by white rot fungi". En: Ware GW (Ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* New York, Springer Verlag, 1991: 122-125.
- Hirsch, A.M. (1992).** *New Phytol.*, 122: 211-237 (1992).
- Hirsch A.M. & Fang Y. (1994).** *Plant Molec. Biol.*, 26: 5-9 (1994).
- Hortenstine C.C. & Rothwell D.F. (1972).** The use of municipal compost in reclamation of phosphate-mining sand tailings. *J. Environ. Qual.*, 1(4), 415- 18.
- Hue N.V. 1990.** Interaction of $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ applied to an Oxisol and previous sludge amendment:soil and crop response. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 21:61-73.
- Hue N.V. 1991.** Effects of organic acids/anions on P sorption and phytoavailability in soils with different mineralogies. *Soil Sci.* 152:463-471.
- Iriarte C. (2003).** "Estudio de la producción y secreción de enzimas celulolíticas en micelios "rápidos" y "lentos" de *P. Ostreatus* ". Ingeniero Técnico Agrícola (Hortofruticultura y Jardinería). Universidad Pública de Navarra.
- Izco, J. 2004.** "Botánica". 2ª ed. McGraw-Hill, Madrid, 2004.
- Jackson, M.L. (1970).** Análisis químico de suelos. 662 pp. Ed. Omega, S.A. Barcelona.
- Jiménez J., Rondón D., Martínez L., and Mataix J. (2001).** "Composición química de los aceites de oliva", en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*, Ed. Universidad de Granada-Puleva Food, 2001, 115-136.
- Jones J.B.Jr., Wolf B., and Mills H.A. (1991).** *Plant Analysis Handbook. I. Methods of Plant Analysis and Interpretation.* Micro-Macro Publishing Inc., USA.
- Jones P.J., Macdougall D.E., Ntanios F., and Vanstone C.A. (1997).** "Dietary phytosterols as cholesterol-lowe-ring agents in humans", *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997; 75: 217-227.
- Jönsson L.J., Palmqvist E., Nilvebrant N.O., and Hahn-Hägerdal B. (1998).** "Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*". *Appl Microbiol Biotechnol* 1998; 49: 691-697.
- Jwanny E.W., Rashad M.M., y Abdu H.M. (1995).** "Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 50(1), 71– 78.
- Kabata-Pendias A., and Pendias H. (1984).** *Trace Elements in Soils and Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kaim W., and Schwederski B. (1991).** "Bioanorganische chemie". Stuttgart: Teubner.

- Kale R.D., Bano K., and Krishnamoorthy R.V. (1982).** Potential of *Perionyx excavatus* for utilization of organic wastes. *Pedobiologia* 23, 419–425.
- Kannan K., Oblisami G., y Loganathan B. (1999).** Enzymology of ligno-cellulose degradation by *Pleurotus sajor-caju* during growth on paper-mill sludge. *Biol. Wastes* 33: 1–8.
- Kaushik, P., Garg, V.S., Singh, B. (2005).** Effect of textile effluents on growth performance of wheat cultivars. *Bioresource Technology*, 96, 1189-1193
- Kavian M.F., Ghatneker S.D., (1991).** Bio-management of dairy effluents using culture of red earthworms (*Lumbricus rubellus*). *Indian J. Environ. Prot.* 11, 680–682.
- Kaviraj P., and Sharma S. (2003).** Municipal solid waste management through vermicomposting employing exotic and local species of earthworms. *Bioresource Technology* 90,169–173
- Kelling K.A. (2000).** Alfalfa fertilization. Wisconsin University Extension. Electronic publication. A2448. www.uwex.edu/ces/pubs/, 8 pp.
- Kerem Z., Friesem D., and Hadar Y. (1992).** "Lignocellulose degradation during solidstate fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*". *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 1121-1127.
- Kersten P.J, Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., and Kirk T.K. (1990).** Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem J* 1990; 268:475-480.
- Khazaal K., Boza J. y Orskov E.R. (1994).** Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the in vitro gas production technique with or without polyvinilpyrrolidone or nylon bag. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49, 133-149.
- King L.D., Leyshon A.J. & Webber L.R. (1977).** Application of municipal refuse and liquid sewage sludge to agricultural land. II. Lysimeter study. *Journal Environmental Quality*, 6, 67-71.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. y Stalpers J. (2001).** *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Koenig R., Hurst C., Barnhill J., Kitchem B., Winger M., and Johnson M. (1999).** Fertilizer management for alfalfa. Utah State University Extension. Electronic publication. AG-FG-01. 5 pp.
- Kohlmeyer J y Kohlmeyer E. (1979).** *Marine Mycology—The Higher Fungi*. Academic Press, New York.
- Kropisz A. & Wojciechowsky J. (1978a).** Mutual effect of mineral fertilizers and composts made from municipal wastes on yields and chemical composition of cabbage. *Rocz. Nauk. Rol., Ser.*, 103(2), 164-80.
- Lal R. 2004.** Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.
- Lanzani, A., Fedeli, E., (1986).** Composition and utilization of olive-mill wastewaters. In: *Tavola Rotonda: Lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi (Accademia Nazionale dell' Olivo)*. Arti grafiche Panetto and Petrelli, Spoleto, Italy, pp. 15–28.

- Larchevêque M., Ballini C., Korboulewsky N., and Montès N. (2006).** The use of compost in afforestation of Mediterranean areas: Effects on soil properties and young tree seedlings. *Science of the Total Environment* 369, 220–230.
- Lee, K.E. (1985).** Earthworms. Their ecology and relationships with soils and land use. Academic Press, Sydney. 411 p.
- Lesage-Meessen L, Navarro D, Maunier S, Sigoillot JC, Delattre J, Simon JL, Asther M & Labat M (2001)** Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.* 75: 501–507
- Linares A., Caba J.M. , Ligeró F., De la Rubia T. y Martínez J. (2003).** Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavido-alba*. *Chemosphere* 51:887-891
- Lindsay W.L. (1972).** Zinc in soils and plant nutrition. *Adv. Agron.* 24, 147–186.
- Lindsay W.L. (1991).** Inorganic equilibria affecting micronutrients in soil. In: *Micronutrients in Agriculture*, 2nd edition (J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. M. Shuman, and R. M. Welch, Eds.), pp. 89–112. Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Lofs-Holmin, A. (1980).** Reproduction and growth of earthworms as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. *Swedish J. Agric. Res.*, 10, 25-33.
- López Lillo, A.; Sánchez de Lorenzo Cáceres, J.M. (1999).** "Árboles en España. Manual de identificación". Editorial Mundi-Prensa.
- Lorite M.J., Cifuentes C., Romero E., Benítez E., Nogales R. (2005).** Effectiveness of olive-derived organic amendments in suppressing *Rhizoctonia solani* in vetch cultures. En: Jiménez Ballesta, R., Alvarez, A.M. (Eds.) *Control de la Degradación de Suelos*, pp 413-417. Universidad Autónoma de Madrid.
- Lymar ES, Li B, Renganathan V. 1995.** " Purification and Characterization of a Cellulose-Binding (beta)-Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 61, No. 8 (1995) 2976-2980.
- M. Tejada J.L., Moreno M.T., Hernández C., and García C. (2007).** Application of two beet vinasse forms in soil restoration: Effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 119, 289-298.
- M.A.P.A. (1986).** Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, productos fitosanitarios y fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- M.A.P.A. (2006).** Métodos oficiales de análisis. Tomo III. Plantas, productos orgánicos, fertilizantes, suelos, agua, productos fitosanitarios y fertilizantes orgánicos. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Maas E.V. (1984).** Salt tolerance of plants. In: Christie, B. R. (ed.) *The handbook of plant science in agriculture*. Boca Raton: CRC.Press.
- Madejon, E., Galli, E., Tomati, U. (1998).** Composting of wastes produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica* 42, 135–146.

- Maire, N., D. Borcard, E. Laczko y W. Matthey (1999).** Organic matter cycling in grassland and strategies of the living communities, *Soil Biol. Biochem.*, 31, 281-1293.
- March L y Ríos L. 1998.** "Aceite de oliva, vida y cultura. Patrimonio cultural olivarero", Madrid, 1998.
- Marcote I., Hernández T., Garcia C., and Polo A. (1998).** Influence of one of two successive annual application of organic fertilizers on the enzyme activity of a soil under barley cultivation. *Bioresource Technology*, 79, 147–154.
- Margulis L. y Schwartz K.V. (1985).** "Cinco reinos. Guía ilustrada de los *phyla* de la vida en la Tierra". Labor, Barcelona 335 pp., ISBN 84-335-5217-1.
- Marschner H. (1995).** Mineral nutrition in higher plants. 2ª ed. American Press.Londres.
- Martín A.I., Moumen A., Yáñez, D.R., Molina E. (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107, 61-74.
- Martínez A., Carcaño M.G., y López L. (2002).** Actividad biológica en un transepto altitudinal de suelos de La Malinche, Tlaxcala. *TERRA Latinoamericana*, vol 20 Nº2, pág 141-146 2002. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México.
- Martínez Nieto L., Rodríguez S., Giménez J.A., Lozano J.L., Muñoz A., Ortega J. y Hodaifa G. (2003).** Efluentes de la industria del aceite de oliva: Contribución al estudio de la composición y tratamiento de las aguas de lavado de aceituna y de aceite. En: *Jornadas de demostración y de transferencia de tecnología*. pp 13-44. INFAOLIVA, Granada.
- Martínez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez F.J., Gutierrez A., and del Río J.C. (2005)** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *INT. MICROBIOL.*, vol.8, no.3, p.1
- Martínez F., Calero B., Nogales R., Rovesti L. (2003).** Lombricultura. Manual práctico. Unidad de producciones gráficas MINREX, Cuba.
- Martirani L, Giardina P, Marzullo L y Sannia G. (1996)** Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.* 30:1914–8.
- Masciandaro G., Ceccanti B., Ronchi V., and Bauer C. (2000).** Kinetic parameters of dehydrogenase in the assessment of the response of soil to vermicompost and inorganic fertilisers. *Biology Fertility & Soils* 32, 479–483.
- Mata, P., y De Oya, M. (1993).** "Dieta y enfermedad cardiovascular", *Revista Clínica Española*, 1993, vol.192; 1:41-64.
- Melgar R. (2003).** Posibilidades de valorización agrícola de subproductos generados por la agroindustria del olivar. Tesis Doctoral. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Universidad de Granada, Granada, España.
- Mellor, R.B. y Collinge, D.B. (1995).** A simple model based on known plant defence reactions is sufficient to explain most aspects of nodulation *J. Exp. Bot.*, 46: 1-18 (1995).

- Mendaza R., & Díaz G. (1981).** "Las setas". Bilbao, España. Editorial Vizcaina. 389p.
- Mercado-Blanco J. & Olivares J. (1993).** Stability and transmissibility of the cryptic plasmids of *Rhizobium meliloti* GR4 - Their possible use in the construction of cloning vectors for Rhizobia. *Archives of Microbiology* 160, 477-485.
- Mitchell A., (1997).** Production of *Eisenia fetida* and vermicompost from feed-lot cattle manure. *Soil Biology Biochem.* 29 (3/4), 763± 766.
- Molina-Alcaide E., Yáñez-Ruiz D.R., Moumen A., Martín-García I. (2003).** Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products. *Small Ruminant Research*, 49, 329-336.
- Monroy F. (2006).** Efecto das miñocas (Clase Oligochaeta) sobre a comunidade descompoñedora durante o proceso de vermicompostaxe. Tesis doctoral. Universidade de Vigo.
- Moorhead D.L. y Reynolds J.F. (1992).** "Modeling the contributions decomposer fungi in nutrient cycling". in: Carroll, G.C. & Wicklow, D.T. *The fungal community. Decker.* New York.
- Morais H., Ramos C., Matos N., Forgacs E. y Cserhati T. (2002).** Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular b-glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *J. Chromat. B* 770:111–119.
- Moreno J.L., García C., Hernández M.T., and Pascual J.A. (1996).** Transference of heavy metals from a calcareous soil amended with sewage-sludge compost to barley plants *Bioresource Technology* 55, 251-258.
- Moreno, R., Benítez, E., Melgar, R., Polo, A., Gómez M. y Nogales, R. (2000).** Vermicomposting as an alternative for reusing by-products from the olive oil industry. *Fresenius Environ. Bull.*, 9, 1-8.
- Müller E, y Loeffler W. (1976).** "Micología". *Omega.* Barcelona.
- Muller H.G. (1988).** "An introduction to tropical food science". Cambridge University Press.
- Murcia M.A., Parras P., Jiménez A.M., Vera A.M. y Martínez-Tomé M. (2003).** "Polifenoles y flavonoides: su importancia en la prevención de enfermedades", en *Nuevos alimentos para nuevas necesidades*, Consejo-ría de Sanidad (CM)-ISP, 2003, 121-142.
- Nannipieri P., & Bollag J.M. (1991).** "Use of enzymes to detoxify pesticide contaminated soils and waters". *J Environ Qual* 1991;20:510-7.
- Nannipieri P., Ceccanti B., Conti C., and Bianchi D. (1982).** Hydrolases extracted from soil: their properties and activities. *Soil Biol. Biochem.*, 14, 257-263.
- Nannipieri P. (1994).** The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. Pankhurst CE. En: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, Grace PR (eds) *Soil biota. Management in sustainable farming systems.* CSIRO, Melbourne, pp 238–244
- Nannipieri P., Grego S. and Ceccanti B. (1990)** Ecological significance of the biological activity in soil. In *Soil Biochemistry*, Vol. 6 (J.M. Bollag and G. Stotzky eds). New York: Marcel Dekker, pp. 293-355.
- Nannipieri P., Pedrazzani F., Arcara P.G. y Piovaneli C. (1979).** Changes in amino acids, enzyme activities and biomasses during soil microbial growth. *Soil Sci.*, 127, 26-34.

- Nedgwa P.M., Thompson S.A. (2000).** Effect of C to N ratio on vermicomposting in the treatment and bioconversion of biosolids. *Bioresource Technol.* 76, 7–12.
- Neuhauser E.F., Loehr R.C. y Malecki M.R. (1988).** The potencial of earthworms for managing sewage sludge. Edwards, C.A. y Neuhauser, E.F. (Eds). En *Earthworms in Waste and Environmental management*. The Hague, Holanda: SPB Academic Publishing BV, pp. 9-20.
- Nogales R., Zamora M.A., Gomez M., & Gallardo-Lara F. (1984).** Evaluaci6n del potencial fertilizante de un compost de basura urbana. Efecto sobre germinaci6n y rendimientos secuenciales de cosecha. *Anal. Edaf. Agrobiol.*, XLIII(1-2), 183-94.
- Nogales R., Elvira C., Benítez E. y Gallardo-Lara F. (1995).** Uso agrÍcola de compost y vermicompost de basuras urbanas (I): Procesos, madurez y calidad de los productos. *Residuos*, 26, 53-57.
- Nogales R., Elvira, C., Benítez E. y Gallardo Lara F. (1996).** Uso agrÍcola de compost y vermicompost de basuras urbanas (III): Capacidad de cesi6n de nutrientes al suelo y la planta. *Residuos*, 29, 61.67.
- Nogales R., Gallardo-Lara F., Benítez E., Soto J., Hervas D., and Polo A. (1997).** Metal availability in a soil after heavy application of nickel and lead in different forms. *Water, Air, and Soil Pollution* 94, 33-44.
- Nogales R., Thompson R., Calmet A., Benítez E., G6mez M., Elvira C. (1998).** Feasibility of vermicomposting residues from oil production obtained using two stages centrifuge. *J. Environ. Sci. Health A33*: 1491-1501.
- Nogales R., Elvira C. Benítez E., Thompson R., G6mez M. (1999a).** Feasibility of vermicomposting dairy biosolids using a modified system to avoid earthworm mortality. *J. Environ. Sci. Health B34*;151-169.
- Nogales, R., Melgar, R., Guerrero, A., Lozada, G., Benítez, E., Thompson, R. y G6mez M. (1999b).** Growth and reproduction of *Eisenia andrei* in dry olive cake mixed with other organic wastes. *Pedobiologie*, 43, 744-752.
- Nogales R.; Cifuentes C.; Benítez E. (2005).** Vermicomposting of winery wastes: A laboratory study. *J. Environ. Sci. & Health, Part B*, 49: 659-673.
- Nogales, R., Benítez, E. (2006).** Absorption of zinc and lead to *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76: 538-544.
- Nogales R., Melgar R., and Benítez E. (2006).** Potential Use of Olive-waste Ash from Cogeneration Plants as Soil Amendment. *Journal Environmental Science & Health, Part B*. 41, 1405-1415.
- Olivieri A., Marzocchella P., Salatino P., Giardina G., Cennamo G., and Sannia G. (2006).** Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 31, Issue 3, Pages 180-187 G.

- Olsen S.R. (1972).** Micronutrient Interactions, in J. J. Mortvedt, P.M. Giordano and W. L. Lindsay (eds.), *Micronutrients in Agriculture*, SSSA, Madison, Wis., p. 243.
- OMS. (1990).** "Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de un Grupo de Estudio de la OMS", OMS. Serie de Informes Técnicos, núm. 797. Ginebra. 1990.
- Ouédraogo E., Mando A., Zombré N.P. (2001).** Use of compost to improve soil properties and crop productivity under low input agricultural system in West Africa. *Agric. Ecosyst. Environ.* Vol. 84, May 2001. pp. 259–266.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000).** "Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene", *Food Chem. Toxicol.* 2000; vol 38. pp. 647-659.
- Pardo VM. (1995).** "Hongos fitopatógenos de Colombia". Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional de Colombia. 166p.
- Parinkina O.M., Klyuyuva N.V., and Petrova L.G. (1994).** Biological activity and effective fertility of soil. *Eurasian Soil Sci.* 26: 73-82.
- Parle, J.N. (1963a).** Micro-organisms in the intestine of the earthworms. *J. Gen. Microbiol.*, 31, 1-11.
- Parle, J.N. (1963b).** A microbiological study of the earthworm casts. *J. Gen. Microbiol.*, 31, 13-22.
- Patrabansh S., and Madan M. (1997).** "Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer on different bio-wastes." *Acta Biotechnology*, 17(2), 107–122.
- Paustian K., Andren O., Janzen H.H., Lal R., Smith P., Tian G., Tiessen H., Van Noordwijk M., and Woomer P.L. (1997).** Agricultural soils as a sink to mitigate CO₂ emissions. *Soil Use and Management* 13, 230- 244.
- Pérez J., De la Rubia T., Moreno J. y Martínez J. (1992).** Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:489-495
- Pérez-Losada M., Eiroa J., Mato S., Domínguez J. (2005).** Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiol.* 49:317–324.
- Perucci P. (1992).** Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology fertility and Soils*, 14, 54-60.
- Petrussi F., De Nobili M., Viotto M., and Sequi P. (1988).** Characterization of organic matter from animal manures after digestion by earthworms. *Plant Soil*, 105, 41-46.
- Phillips J.M. and Hayman D.S. (1970).** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55, pp. 158–161.
- Pichler M., Knicker H., Kögel-Knabner I. (2001).** Soil-state ¹³C NMR spectroscopic, chemolytic and biological assessment of pretreated municipal solid waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 83–89.

- Pina, T. (1997).** El orujo de almazara. El aceite de oliva. Actas del VIII Simposio Científico-Técnico Expoliva 1997. Jaén.
- Platt M.W., Hadar Y., and Chet I. (1984).** "Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*". European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v.20, p.150-154, 1984.
- Pocoví M, Cenarro A y Civeira F.(1998).** "Algunos aspectos antiaterogénicos y beneficiosos de la HDL", Clin. Invest. Arteriosclerosis, 1998, vol. 10; 6: 303-309.
- Prescott LM, Harley JP, y Klein DA. (1999).** "Microbiología" (4ª ed.). McGraw-Hill-Interamericana. Madrid.
- Primo E. (1997).** "Química de los alimentos" ,Ed. Síntesis, S.A., Madrid,1997, 164-227.
- Rangaswami G. Kandaswami T.K. y Ramasamy K. (1975).** *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer, a protein rich nitrogen fixing mushroom fungus. Curr. Sci. 44: 403–404.
- Ridge E.H. and Rovira A.D. (1971).** Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. New Phytol. 70: 1017-1026.
- Riffaldi R., Levi-Minzi R., Pera A. & de Bertoldi M. (1986).** Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analysis. *Waste Manag. Res.*, 4(4), 387-396.
- Robles A., Lucas R., Álvarez de Cienfuegos G. y Gálvez A. (2000).** Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. Enzyme Microbial Tech. 26:484-490.
- Rodríguez S., Fernández M., Bermúdez R., y Morris H. (2003).** "Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp.".Rev Iberoam Micol 2003; 20: 164-168.
- Romero A., Rodríguez A., y Pérez R. (2002).** "Pleurotus ostreatus. Importancia y tecnología de cultivo". Grupo de Nutrición, Departamento de Física – Química, Facultad de Mecánica, Universidad de Cienfuegos "Carlos Rafael Rodríguez", Cuatro caminos, Ciudad de la Habana.
- Romero E., Benítez E. y Nogales R. (2005).** Suitability of wastes from olive-oil industry for initial reclamation of a Pb/Zn mine tailing. Water, Air, Soil Pollution, 165, 153-165.
- Romero E., Melgar R., Benítez E. y Nogales R. (2003).** Enzymes activities in a lead/zinc mine tailing amended with wastes from olive oil industry. *Soil Biol. Biochem.*, En prensa.
- Romero E., Plaza C., Senesi, N., Nogales, R., Polo, A. (2006b).** Humic acid-like fractions in raw and vermicomposted winery and distillery wastes. *Geoderma*. En prensa.
- Romero E., Salido A., Cifuentes C., Fernández J.D., Nogales R. (2006a).** Effect of vermicomposting process on pesticides sorption capability using agroindustrial wastes. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 86: 289-297.
- Saavedra, M., Benítez, E., Cifuentes, C., Nogales, R. (2006).** Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation*, 17: 93-102.
- Sánchez-Monedero M.A., Roig A., Paredes C., and Bernal M.P. (2001).** Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresource Technology* 78 (3): 301-308

- Satchell J.E., Martin K., (1984).** Phosphate activity in earthworm faeces. *Soil Biol. Biochem.* 16, 191–194.
- Saviozzi, A., Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Scagnozzi, A. y Vanni, G. (1993).** Decomposition of vegetation-water sludge in soil. *Biores. Technol.*, 44, 223-228
- Schlegel H.G. (1993).** "General microbiology". 7 ed. Cambridge University Press 1993, pp. 234-244, 446-464.
- Schmidt P., Wechsler F., Nascimento J.S., Miranda de Vargas F. (2003).** "Tratamento do Feno de Braquiária pelo Fungo *Pleurotus ostreatus*" R. Bras. Zootec., v.32, n.6, p.1866-1871, 2003 (Supl. 2).
- Senesi N. (1989).** Composted materials as organic fertilizers. *Sci. Total Environ.* 81/82, 521–524.
- Shahidi F., y Naczki M. (1995).** Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Technomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Shaykh, M.N. y L.W. Roberts. (1974).** A histochemical study of phosphatase in root apical meristems. *Ann. Bot.* 38: 165-174.
- Shoham Y., Lamed R., and Bayer E.A. (1999).** "The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides". *Trends in Microbiology* 7: 275-281, 1999.
- Shützendüel A., Majancherczk A. (1999).** "Degradation of fluorene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*". *International Biodeterioration* 1999; 43:93-100.
- Silva F.C., e Basso L.C. (1993).** "Avaiiação da disponibilidade de fósforo, por diversos extratores, em amostras de solos cultivados com cana-de-acucar. R. Bras. Ci. Solo, 17: 371-375.
- Simek M., Pizi V., y Chalupskiy J. (1991).** The effect of some terrestrial oligochaeta on nitrogenase activity in the soil. *Plant Soil*, 137, 161-165.
- Singh A., and Sharma S. (2002).** Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Biores. Technol.* 85:107-111
- Sjoblad R.D., Bollag J.M. (1981).** "Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms". In: Paul EA, Ladd JN, editors. *Soil biochemistry*, Vol. 5. New York: Marcel–Dekker. p. 113–52.
- Skujins J. (1973).** Deshidrogenase: An indicator biological activities in soils. *Bull. Ecol.Res.Común.* 17: 233-241.
- Smith T.J. (2000).** "Squalene: potential chemopreventive agent" , *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2000; 9: 1841-1848.
- Soil Survey Staff. (1998).** Keys to soil taxonomy 8th edition. Natural resources Conservation Service USDA, Washington DC, USA.
- Soltanpour, P.N. y Schwab, A.P. (1977).** A new soil test for simultaneous extraction of macro and micronutrients in alkaline soils, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 8, 195-207.
- Soumaré M., Demeyer A., Tack F.M.G., and Verloo M.G. (2002).** Nutrient availability in the surface horizons of Malian tropical agricultural soils. *Tropicultura* 20, 58–63.

- Soumaré M., Tack F.M.G., Verloo M.G. (2003).** Effects of a municipal solid waste compost and mineral fertilization on plant growth in two tropical agricultural soils of Mali. *Bioresource Technology*, vol 86 (1), pp. 15-20.
- Spatafora J, and M. Blackwell. (1993).** "Molecular systematics of unitunicate perithecial Ascomycetes. The Clavicipitales - Hypocreales connection". *Mycologia* 85:912-922.
- Spatafora JW. (1995).** "Ascomal evolution among filamentous ascomycetes: evidence from molecular data". *Can. J. Bot.* S811-S815.
- Stamets P y Chilton J.S. (1983).** "The Mushroom Cultivator". Washington. Ed. Agarikon Press Olimpia. 415p.
- Stampfer M J, y Rimm E B. (1995).** "Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular di-sease", *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: S1365-S1369.
- Stevenson F.J. (1986).** *Cycles of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphorous, Sulfur, and Micronutrients.* Wiley, New York.
- Stevenson F.J. (1991).** Organic matter-micronutrient reactions in soils. In: *Micronutrients in Agriculture*, 2nd edition (J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. M. Shuman, and R. M. Welch, Eds.), pp. 145-186. Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI.
- Tabatabai M.A. (1994).** Soil Enzymes. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties* (Book series No. 5). 775-833 p.). Mickelson and J.M. Bigham (Eds). Madison, Wisconsin.
- Talashilkar S.C., Bhangarath P.P., and Mehta V.P. (1999).** Changes in chemical properties during composting of organic residues as influenced by earthworm activity. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 47, 50-53.
- Tamez G.P. & Peña-Cabriales J.J. (1989).** Estudio sobre la simbiosis Rhizobium-jicama (*Pachyrhizus erosus*, Urbam) II Reunión Nacional de la Fijación Biológica de N₂. Guadalajara, Jalisco.
- Tarafdar J.C. y Classen N. (1988).** Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soil.* 5: 308-312.
- Tate R. L. (1987).** "Soil Organic Matter: Biological and Ecological Effects." Wiley, New York.
- Taylor J.W., Bowman B, Berbee M.L. and White T.J. (1993).** "Fungal model organisms: phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus* and *Neurospora*". *Syst. Biol.* 42:440-457.
- Thies E., Bohlool B., & Singleton W. (1992).** Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced starins. *Can J. Microbiol.* 38:493-500.
- Thurston C.F. (1994).** " The structure and function of fungal laccase". *Microbiology* 140, 19-26.
- Tiquia, S., Wan, J. y Tam, N. (2001).** Extracellular enzyme profiles during co-composting of poultry manure and yard trimmings, *Process Biochemistry*, 36, 8-9, 813-820.
- Tomati U., Galli E., Di Lena G. y Buffone R. (1991).** Induction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive oil waste waters. *Agrochimica* 35:273-279.

- Tomati, U., Grappelli, A. y Galli, E. (1987).** The presence of growth regulators in earthworm-worked wastes. Bonvicini, A. M. (Ed). En *Earthworm. Cool. U.Z.I. Sel. Symp. Mon.*, 2, Mucchi Ed., Modena. pp. 423-435.
- Tour U. Winterhalter K. y Fiechter A. (1995).** Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41:1-17.
- Trasar-Cepeda C., Leirós C., Gil-Sotres F., and Seoane S. (1997).** Towards a biochemical quality index for soils: An expression relating several biological and biochemical properties. *Biology and Fertility of Soils*, vol 26 (2): 100-106
- Trautmann T., and Olynciw E. (2000).** .Cornell Composting Science & Engineering. <http://www.cfe.cornell.edu/compost/microorg.html>.
- Trevors J.T. (1984).** Dehydrogenase activity in soil. A comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 673-674.
- Trouvelot, A., Kough J.L., and Gianinazzi-Pearson V. (1986).** Measure du taux de mycorrhization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methodes d'estimation ayand une signification fonctionnelle. In: *Mycorrhizae. Physiology and genetics.* 1er Simposio Europeo de Micorrizas. INRA, Paris. p 626-630.
- Tsimidou M. (1998).** Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital J Food Sci* 1998;2,(10): 99-116.
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. y Aggelis G. (2002).** Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biores. Technol.* 84:251-257
- Uceda M. (2000).** "Aceites de oliva vírgenes extra. Calidad y diversidad", Patrimonio Comunal Olivarero, 2000.
- Verma D.P.S. (1992).** *Plant Cell*, 4:373-382 (1992).
- VI Censo Nacional Agropecuario. 1997.** Instituto Nacional de Estadística, INE. República de Chile.
- Vignote S., y Jiménez F.J. (1996).** "Tecnología de la madera". M.A.P.A. Madrid : Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Centro de Publicaciones: Mundi-Prensa.
- Vilar J., Stahnke W.B., Geissen K. (2003).** "Extracción de Aceite de Oliva: Calidad por Tradición". EA Westfalia Separator.
- Vizcayno C., y García-González M.T. (2000).** Efecto de la aplicación de yeso y de yeso+caliza en las formas de Al extraíble de unos suelos ácidos. *Edafología.* Volumen 7-3. Septiembre 2000. pág 227-239.
- Wagai R., y Sollins P. (2002).** Biodegradation and regeneration of water-soluble carbon in a forest soil: leaching column study. *Biology and Fertility of Soils* 35: 18-26
- Webber J. (1980).** "Metals in Sewage Sludge Applied to the Land and Their Effect on Crops". *Inorganic Pollution and Agriculture*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, *Reference Book* 326, 222.
- Wesenberg D., Kyriakides I., and Agathos S.N. (2003).** White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv.* 22:161-187.

- Whiston R.A., Seal K.J. (1988).** The occurrence of cellulases in the earthworm *Eisenia foetida*. *Biol. Wastes* 25, 239–242.
- Wolf, B. (1982).** A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 13,1035-1059.
- Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., and Varfolomeyev S.D. (1994).** "Laccase properties, catalytic mechanism and applicability". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49,1994; 257-280.
- Zadrazil F., and Kurtzman R.H. (1981).** "The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics". In: Chang ST & Quimio TH. *Tropical Mushrooms*, pp. 493. Hong Kong: The Chinese Univ. Press. 1981, Shatin.
- Zengeni R., Mpeperekwi S., Giller K.E. (2006).** Manure and soil properties affect survival and persistence of soyabean nodulating rhizobia in smallholder soils of Zimbabwe. *Applied Soil Ecology* 32, 232–242.
- Zucconi, F., Forte M., Monaco A., and de Bertoldi M. (1981a).** Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle* 22,2: 27-29.
- Zucconi F., Pera A., Forte M., and de Bertoldi M. (1981b).** Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* 22,2: 54-57.

ANEXO. CONTRASTES POST HOC (TEST DE BONFERRONI)

Tabla 1. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **pH**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

		Bonferroni test; variable pH Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,06689, df = 84,000																												
Cell No.	Tratamiento	días	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
1	P	0	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,001	0,039	1,000	1,000	6,4900	6,6850	5,9925	6,0950	7,8850	7,4900	6,8550	6,5050	6,7625	5,9975	4,7350	5,9150	6,2175	6,5900	6,9100	6,8900
2	P	30	1,000	0,000	0,020	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,012	0,000	0,000	1,000	1,000	0,323	0,000	0,058	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,835	0,595
3	P	60	0,000	0,000	1,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,236	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	P	90	0,000	0,020	1,000	0,236	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,081	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	P	120	1,000	1,000	0,001	0,236	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,001	0,000	0,000	1,000	1,000	0,028	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,081	0,055
6	P	150	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,004	0,064	0,001	1,000	1,000	0,546	1,000	0,000	0,000	0,015	1,000	1,000	0,705	1,000	0,000	0,000	0,000	0,003	1,000	1,000	1,000	
7	P	180	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,004	0,010	1,000	1,000	0,041	1,000	0,000	0,000	0,226	1,000	1,000	0,055	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,270	1,000	1,000
8	AP (1:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,421	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,157	0,226
9	AP (1:1)	30	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,004	1,000	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	AP (1:1)	60	0,039	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,010	0,000	0,000	1,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	AP (1:1)	90	1,000	1,000	0,000	0,081	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,028	1,000	0,000	0,003	0,000	0,000	1,000	1,000	0,085	0,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,236	0,164
12	AP (1:1)	120	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,001	0,028	1,000	0,000	0,015	0,595	0,000	0,000	0,546	1,000	1,000	0,021	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,108	1,000	1,000
13	AP (1:1)	150	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,546	0,041	1,000	1,000	0,000	0,000	0,015	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,870	1,000	1,000	1,000	1,000	
14	AP (1:1)	180	0,440	0,012	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,003	0,595	1,000	0,108	0,000	0,000	0,000	0,012	1,000	1,000	1,000	0,119	0,000	0,024	1,000	1,000	1,000	
15	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,108	1,000	1,000	0,000	0,000	0,004	1,000	0,024	1,000	0,000	0,000	0,595	0,001	0,002	
16	AP (2:1)	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,676	1,000	0,000	0,000	0,000	0,029	1,000	0,172	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,010	0,015
17	AP (2:1)	60	0,736	1,000	0,236	1,000	1,000	0,015	0,226	0,000	0,000	1,000	1,000	0,546	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	AP (2:1)	90	1,000	1,000	0,000	0,021	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,012	0,000	0,000	1,000	0,309	0,000	0,055	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,800	0,570	
19	AP (2:1)	120	1,000	0,323	0,000	0,000	0,028	1,000	1,000	0,421	1,000	0,000	0,085	1,000	1,000	1,000	0,004	0,029	0,000	0,309	1,000	1,000	0,004	0,000	0,001	0,296	1,000	1,000	1,000	
20	AP (2:1)	150	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,705	0,055	1,000	1,000	0,000	0,000	0,021	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,676	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
21	AP (2:1)	180	1,000	0,058	0,000	0,000	0,004	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,014	1,000	1,000	1,000	0,024	0,172	0,000	0,055	1,000	1,000	0,027	0,000	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	
22	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,119	1,000	1,000	0,000	0,000	0,004	1,000	0,027	0,000	1,000	0,648	0,001	0,002		
23	A	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	A	60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,870	0,024	1,000	1,000	0,000	0,000	0,001	0,676	0,005	1,000	0,000	1,000	0,150	0,000	0,000	
25	A	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,296	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,108	0,157
26	A	120	0,078	0,002	0,000	0,000	0,000	1,000	0,270	1,000	1,000	0,000	0,000	0,108	1,000	1,000	0,595	1,000	0,000	0,002	1,000	1,000	0,648	0,000	0,150	1,000	1,000	1,000	1,000	
27	A	150	1,000	0,835	0,000	0,000	0,081	1,000	1,000	0,157	1,000	0,000	0,236	1,000	1,000	1,000	0,001	0,010	0,000	0,800	1,000	1,000	1,000	0,001	0,000	0,000	0,108	1,000	1,000	
28	A	180	1,000	0,595	0,000	0,000	0,055	1,000	1,000	0,226	1,000	0,000	0,164	1,000	1,000	1,000	0,002	0,015	0,000	0,570	1,000	1,000	1,000	0,002	0,000	0,000	0,157	1,000	1,000	

Tabla 2. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Carbono orgánico total**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Carbono orgánico total														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = 400,63, df = 36,000														
Cell No.	Tratamiento	días	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
			570,91	478,50	462,12	537,95	371,00	360,52	537,73	427,75	367,90	515,50	420,29	402,25
1	P	0		0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000
2	P	90	0,000		1,000	0,011	0,000	0,000	0,012	0,065	0,000	0,856	0,014	0,000
3	P	180	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,039	0,362	0,010
4	AP (1:1)	0	1,000	0,011	0,000		0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
5	AP (1:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,019	1,000	0,000	0,087	1,000
6	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,002	1,000	0,000	0,010	0,368
7	AP (2:1)	0	1,000	0,012	0,000	1,000	0,000	0,000		0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
8	AP (2:1)	90	0,000	0,065	1,000	0,000	0,019	0,002	0,000		0,010	0,000	1,000	1,000
9	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,010		0,000	0,047	1,000
10	A	0	0,025	0,856	0,039	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000		0,000	0,000
11	A	90	0,000	0,014	0,362	0,000	0,087	0,010	0,000	1,000	0,047	0,000		1,000
12	A	180	0,000	0,000	0,010	0,000	1,000	0,368	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	

Tabla 3. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Carbono hidrosoluble**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

			Bonferroni test; variable Carbono hidrosoluble Probabilities for Post-Hoc Tests Error: Between MS = 80,673, df = 84,000																											
Cell No.	Tratamiento	días	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
1	P	0		0,279	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	P	30	0,279		1,000	0,000	1,000	0,002	0,074	0,000	1,000	0,042	0,000	0,064	0,005	0,189	0,000	0,006	0,000	0,000	0,002	0,028	0,967	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111
3	P	60	0,001	1,000		0,145	1,000	0,526	1,000	0,000	1,000	1,000	0,001	1,000	0,967	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,464	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	1,000
4	P	90	0,000	0,000	0,145		1,000	1,000	1,000	1,000	0,464	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,464	1,000	0,760	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	
5	P	120	0,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,064	1,000	1,000	0,166	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	1,000	
6	P	150	0,000	0,002	0,526	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,127	1,000	0,216	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	
7	P	180	0,000	0,074	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,004	1,000	0,007	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	
8	AP (1:1)	0	0,000	0,000	0,000	1,000	0,064	1,000	1,000		0,001	1,000	1,000	1,000	0,526	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,097	0,000	0,000	0,000	0,127	1,000	1,000	0,857
9	AP (1:1)	30	0,000	1,000	1,000	0,464	1,000	1,000	1,000	0,001		1,000	0,003	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,042	1,000
10	AP (1:1)	60	0,000	0,042	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,007	1,000	0,013	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
11	AP (1:1)	90	0,000	0,000	0,001	1,000	0,166	1,000	1,000	1,000	0,003	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,246	0,000	0,000	0,000	0,049	1,000	1,000	1,000
12	AP (1:1)	120	0,000	0,064	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,005	1,000	0,009	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
13	AP (1:1)	150	0,000	0,005	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,064	1,000	0,111	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
14	AP (1:1)	180	0,000	0,189	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,526	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,001	1,000	0,003	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,857	1,000	1,000
15	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,464	0,000	0,127	0,004	1,000	0,000	0,007	1,000	0,005	0,064	0,001		0,049	1,000	0,018	0,145	0,012	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	1,000	0,003
16	AP (2:1)	30	0,000	0,006	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,049		0,085	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
17	AP (2:1)	60	0,000	0,000	0,000	0,760	0,000	0,216	0,007	1,000	0,000	0,013	1,000	0,009	0,111	0,003	1,000	0,085		0,010	0,246	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,005
18	AP (2:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,010		0,000	0,000	0,000	0,021	0,064	1,000	1,000	0,000	0,000	
19	AP (2:1)	120	0,000	0,002	0,464	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,145	1,000	0,246	0,000		1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
20	AP (2:1)	150	0,000	0,028	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	0,021	0,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
21	AP (2:1)	180	0,000	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,097	1,000	1,000	0,246	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,166	1,000	1,000
22	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000	1,000	0,318	0,857	0,000	0,000	0,000	0,000
23	A	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,000	1,000		0,857	0,000	0,000	0,000	0,000
24	A	60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,318	0,857		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	A	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,127	0,000	0,000	0,049	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,074	0,003	0,000
26	A	120	0,000	0,000	0,000	1,000	0,111	1,000	1,000	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000	0,857	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,166	0,000	0,000	0,000	0,074	1,000		1,000
27	A	150	0,000	0,000	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,042	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,003	1,000		1,000
28	A	180	0,000	0,111	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,857	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,003	1,000	0,005	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	

Tabla 4. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Carbono extraíble total**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Carbono extraíble total														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = 48,806, df = 36,000														
Cell No.	Tratamiento	días	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
			96,250	79,000	125,75	130,50	133,25	125,50	152,00	140,75	137,75	278,21	117,50	110,97
1	P	0		0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,339
2	P	90	0,085		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	P	180	0,000	0,000		1,000	1,000	1,000	0,000	0,293	1,000	0,000	1,000	0,329
4	AP (1:1)	0	0,000	0,000	1,000		1,000	1,000	0,007	1,000	1,000	0,000	0,821	0,023
5	AP (1:1)	90	0,000	0,000	1,000	1,000		1,000	0,036	1,000	1,000	0,000	0,195	0,004
6	AP (1:1)	180	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,256	1,000	0,000	1,000	0,376
7	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,007	0,036	0,000		1,000	0,434	0,000	0,000	0,000
8	AP (2:1)	90	0,000	0,000	0,293	1,000	1,000	0,256	1,000		1,000	0,000	0,002	0,000
9	AP (2:1)	180	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,434	1,000		0,000	0,015	0,000
10	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000
11	A	90	0,008	0,000	1,000	0,821	0,195	1,000	0,000	0,002	0,015	0,000		1,000
12	A	180	0,339	0,000	0,329	0,023	0,004	0,376	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	

Tabla 5. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Ácidos húmicos**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Ácidos húmicos														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = 15,396, df = 36,000														
Cell No.	Tratamiento	días	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
			33,000	53,750	85,750	46,750	60,250	73,000	62,000	75,250	88,500	65,250	32,000	39,250
1	P	0		0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000
2	P	90	0,000		0,000	1,000	1,000	0,000	0,345	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000
3	P	180	0,000	0,000		0,000	0,000	0,003	0,000	0,037	1,000	0,000	0,000	0,000
4	AP (1:1)	0	0,001	1,000	0,000		0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,687
5	AP (1:1)	90	0,000	1,000	0,000	0,001		0,003	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
6	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,003	0,000	0,003		0,022	1,000	0,000	0,548	0,000	0,000
7	AP (2:1)	0	0,000	0,345	0,000	0,000	1,000	0,022		0,002	0,000	1,000	0,000	0,000
8	AP (2:1)	90	0,000	0,000	0,037	0,000	0,000	1,000	0,002		0,002	0,062	0,000	0,000
9	AP (2:1)	180	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002		0,000	0,000	0,000
10	A	0	0,000	0,013	0,000	0,000	1,000	0,548	1,000	0,062	0,000		0,000	0,000
11	A	90	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,859
12	A	180	1,000	0,000	0,000	0,687	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,859	

Tabla 6. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Polifenoles**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **Fenoles**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = 1,1415, df = 84,000

Cell No.	Tratamiento	días	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
			0,0000	4,5000	5,9050	11,180	6,1775	7,0925	7,0375	17,910	10,860	10,453	10,935	10,553	7,1375	5,0650	23,405	14,580	13,960	13,985	13,850	9,5025	6,8175	37,050	34,625	26,807	18,547	12,637	12,220	10,103
1	P	0		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	P	30	0,000		1,000	0,000	1,000	0,353	0,446	0,000	0,000	0,000	0,000	0,291	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	P	60	0,000	1,000		0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	P	90	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,008	0,155	0,139	0,252	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
5	P	120	0,000	1,000	1,000	0,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
6	P	150	0,000	0,353	1,000	0,000	1,000		1,000	0,000	0,001	0,010	0,001	0,006	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,756	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054
7	P	180	0,000	0,446	1,000	0,000	1,000	1,000		0,000	0,001	0,008	0,001	0,005	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,603	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042
8	AP (1:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
9	AP (1:1)	30	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,001	0,001	0,000		1,000	1,000	1,000	0,002	0,000	0,000	0,002	0,035	0,031	0,060	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
10	AP (1:1)	60	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,010	0,008	0,000	1,000		1,000	1,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,005	0,004	0,008	1,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
11	AP (1:1)	90	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,001	0,001	0,000	1,000	1,000		1,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,051	0,045	0,084	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
12	AP (1:1)	120	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,006	0,005	0,000	1,000	1,000	1,000		0,008	0,000	0,000	0,000	0,008	0,007	0,014	1,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
13	AP (1:1)	150	0,000	0,291	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,002	0,012	0,001	0,008		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,907	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067
14	AP (1:1)	180	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
16	AP (2:1)	30	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,012	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,926	0,000
17	AP (2:1)	60	0,000	0,000	0,000	0,155	0,000	0,000	0,000	0,000	0,035	0,005	0,051	0,008	0,000	0,000	0,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,001
18	AP (2:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,139	0,000	0,000	0,000	0,001	0,031	0,004	0,045	0,007	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,001
19	AP (2:1)	120	0,000	0,000	0,000	0,252	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,008	0,084	0,014	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,001
20	AP (2:1)	150	0,000	0,000	0,003	1,000	0,012	0,756	0,603	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,907	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,236	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030	0,205	1,000
21	AP (2:1)	180	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,001	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,236	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014
22	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,711	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	A	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,711		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	A	60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	A	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
26	A	120	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,450	1,000
27	A	150	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,926	1,000	1,000	1,000	0,205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000
28	A	180	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001	0,054	0,042	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	1,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,450	1,000	

Anexo. Tablas estadísticas

Tabla 7. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad lacasa-siringaldazina**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Lacasa-Siringaldazina Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00015, df = 84,000																														
Cell No.	Tratamiento	días	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)
1	P	0	0,0000	0,00258	0,00860	0,07867	0,21698	0,6560	0,00275	0,0000	0,00198	0,01423	0,19455	0,39575	0,5445	0,00225	0,0000	0,00133	0,01950	0,15987	0,08718	0,08925	0,02877	0,0000	0,0000	0,00620	0,14713	0,08587	0,03155	0,02780
2	P	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,036	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,534	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,190	0,756
3	P	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,950	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,496	1,000
4	P	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
5	P	120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	P	150	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,360	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,071	0,015
7	P	180	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,108	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,529	1,000
8	AP (1:1)	0	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,036	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,534	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,190	0,756
9	AP (1:1)	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,079	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,399	1,000
10	AP (1:1)	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
11	AP (1:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	AP (1:1)	120	0,036	0,101	0,950	0,002	0,000	0,360	0,108	0,036	0,079	1,000	0,000	0,000	1,000	0,089	0,036	0,061	1,000	0,000	0,000	1,000	0,036	0,036	0,402	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000
13	AP (1:1)	150	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,049	0,000	0,120	0,053	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,199	1,000	1,000
14	AP (1:1)	180	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,089	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,441	1,000
15	AP (2:1)	0	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,036	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,534	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,190	0,756
16	AP (2:1)	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,061	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,856	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,313	1,000
17	AP (2:1)	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,049	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
18	AP (2:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
19	AP (2:1)	120	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
20	AP (2:1)	150	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
21	AP (2:1)	180	0,534	1,000	1,000	0,000	0,000	0,023	1,000	0,534	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,534	0,856	1,000	0,000	0,000	0,000	0,534	0,534	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
22	A	0	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,036	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,534	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,190	0,756
23	A	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,036	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,534	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,190	0,756
24	A	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,402	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
25	A	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
26	A	120	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,199	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
27	A	150	0,190	0,496	1,000	0,000	0,000	0,071	0,529	0,190	0,399	1,000	0,000	1,000	1,000	0,441	0,190	0,313	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,190	0,190	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
28	A	180	0,756	1,000	1,000	0,000	0,000	0,015	1,000	0,756	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,756	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,756	0,756	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000

Tabla 8. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad lacasa-ABTS**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **Lacasa-ABTS**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = ,00019, df = 84,000

Cell No.	Tratamiento	días	{1} 0,0000	{2} ,00493	{3} ,01915	{4} ,14393	{5} ,29120	{6} ,03588	{7} ,02913	{8} 0,0000	{9} ,00725	{10} ,02560	{11} ,23033	{12} ,03762	{13} ,02855	{14} ,02730	{15} 0,0000	{16} ,00508	{17} ,02320	{18} ,11768	{19} ,09003	{20} ,06313	{21} ,03645	{22} 0,0000	{23} ,00130	{24} ,00053	{25} ,19243	{26} ,14277	{27} ,03605	{28} ,01736
1	P	0		1,000	1,000	0,000	0,000	0,131	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,070	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,123	1,000
2	P	30	1,000		1,000	0,000	0,000	0,694	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,391	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,576	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,656	1,000
3	P	60	1,000	1,000		0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,006	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
4	P	90	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	0,000	0,000
5	P	120	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	P	150	0,131	0,694	1,000	0,000	0,000		1,000	0,131	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,131	0,728	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,131	0,207	0,158	0,000	0,000	1,000	1,000
7	P	180	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,252	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	
8	AP (1:1)	0	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,131	1,000		1,000	1,000	1,000	0,000	0,070	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,000	1,000	1,000	0,000	0,123	1,000
9	AP (1:1)	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,834	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
10	AP (1:1)	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000
11	AP (1:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	AP (1:1)	120	0,070	0,391	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,070	0,834	1,000	0,000		1,000	0,070	0,411	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,070	0,112	0,085	0,000	0,000	1,000	1,000	
13	AP (1:1)	150	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,207	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
14	AP (1:1)	180	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,133	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
15	AP (2:1)	0	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,131	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,070	1,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,123	1,000
16	AP (2:1)	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,728	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,411	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,605	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,688	1,000	
17	AP (2:1)	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,030	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000
18	AP (2:1)	90	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
19	AP (2:1)	120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	AP (2:1)	150	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	1,000	0,252	0,000	0,000	0,073	0,000	1,000	0,207	0,133	0,000	0,000	0,030	0,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,003
21	AP (2:1)	180	0,107	0,576	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,107	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,107	0,605	1,000	0,000	0,000	1,000	0,107	0,169	0,129	0,000	0,000	1,000	1,000	
22	A	0	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,131	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,070	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,107	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,123	1,000
23	A	30	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,207	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,112	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,169	1,000		1,000	0,000	0,000	0,194	1,000
24	A	60	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,158	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,085	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,129	1,000	1,000		0,000	0,000	0,148	1,000	
25	A	90	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
26	A	120	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001		0,000	0,000
27	A	150	0,123	0,656	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,123	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,123	0,688	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,123	0,194	0,148	0,000	0,000		1,000
28	A	180	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,003	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	

Tabla 9. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Hemicelulosa, celulosa y Lignina**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Hemicelulosa										
Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between MS = 26,292, df = 16,000										
Cell No.	Tratamiento	días	{1} 300,00	{2} 175,33	{3} 204,33	{4} 152,67	{5} 176,00	{6} 149,00	{7} 108,00	{8} 89,667
1	P	0		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	P	180	0,000		0,000	0,002	1,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	0,002	0,000		0,001	1,000	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	1,000	0,000	0,001		0,000	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000		0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,013
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	

Bonferroni test; variable Celulosa										
Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between MS = 67,375, df = 16,000										
Cell No.	Tratamiento	días	{1} 379,00	{2} 281,33	{3} 253,67	{4} 191,33	{5} 222,00	{6} 184,67	{7} 127,67	{8} 101,33
1	P	0		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	P	180	0,000		0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,022		0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000		0,009	1,000	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,006	0,009		0,001	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001		0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,034
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	

Bonferroni test; variable Lignina										
Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between MS = 17,292, df = 16,000										
Cell No.	Tratamiento	días	{1} 59,000	{2} 45,000	{3} 140,33	{4} 112,67	{5} 167,33	{6} 127,00	{7} 221,67	{8} 207,00
1	P	0		0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	P	180	0,022		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,000		0,000	0,000	0,034	0,000	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000		0,000	0,018	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,034	0,018	0,000		0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,015
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	

Tabla 10. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad deshidrogenasa**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Deshidrogenasa Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1414,1, df = 84,000																														
Cell No.	Tratamiento	días	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}	{25}	{26}	{27}	{28}
			39,000	215,50	215,00	190,25	241,00	336,25	309,50	56,000	116,50	259,00	291,25	456,50	553,00	379,25	59,000	42,250	151,75	90,250	340,75	463,25	439,25	17,250	4,7250	11,750	27,250	53,000	57,500	39,500
1	P	0		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,022	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	P	30	0,000		1,000	1,000	1,000	0,007	0,252	0,000	0,134	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	P	60	0,000	1,000		1,000	1,000	0,007	0,237	0,000	0,143	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	P	90	0,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,009	0,001	1,000	1,000	0,104	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	1,000	0,118	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000
5	P	120	0,000	1,000	1,000	1,000		0,216	1,000	0,000	0,004	1,000	1,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,449	0,000	0,122	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	P	150	0,000	0,007	0,007	0,000	0,216		1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,008	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,003	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	P	180	0,000	0,252	0,237	0,009	1,000	1,000		0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	AP (1:1)	0	1,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,202	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	AP (1:1)	30	1,000	0,134	0,143	1,000	0,004	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,130	0,025	0,064	0,449	1,000	1,000	1,000
10	AP (1:1)	60	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,046	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	AP (1:1)	90	0,000	1,000	1,000	0,104	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,521	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	AP (1:1)	120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,184	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
13	AP (1:1)	150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,184		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,423	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	0,000	0,000	0,008	0,521	1,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,832	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	AP (2:1)	0	1,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,294	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
16	AP (2:1)	30	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,034	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
17	AP (2:1)	60	0,022	1,000	1,000	1,000	0,449	0,000	0,000	0,202	1,000	0,046	0,000	0,000	0,000	0,000	0,294	0,034		1,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,004	0,139	0,244	0,023
18	AP (2:1)	90	1,000	0,004	0,004	0,118	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
19	AP (2:1)	120	0,000	0,004	0,003	0,000	0,122	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,014	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,005	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	AP (2:1)	150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,423	0,832	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
21	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,019	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
22	A	0	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,130	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,001	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
23	A	30	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,697	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
24	A	60	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
25	A	90	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,449	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,004	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
26	A	120	1,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,139	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
27	A	150	1,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,244	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
28	A	180	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,023	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 11. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad β -glucosidasa**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

			Bonferroni test; variable β -glucosidasa Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1145E3, df = 84,000																													
Cell No.	Tratamiento	días	(1) 113,00	(2) 3386,5	(3) 5665,8	(4) 21538,	(5) 12744,	(6) 10773,	(7) 5275,0	(8) 22,000	(9) 1264,5	(10) 6394,0	(11) 10876,	(12) 4525,0	(13) 6699,5	(14) 5954,3	(15) 102,00	(16) 927,25	(17) 3216,0	(18) 4701,0	(19) 2152,5	(20) 3979,8	(21) 2661,3	(22) 13,000	(23) 1538,8	(24) 1631,3	(25) 1996,3	(26) 2497,8	(27) 1380,5	(28) 2605,0		
1	P	0		0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,036	0,000	1,000	0,001	0,433	1,000	1,000	1,000	1,000	0,851	1,000	0,548		
2	P	30	0,016		1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,010	1,000	0,056	0,000	1,000	0,013	0,399	0,015	0,628	1,000	1,000	1,000	1,000	0,010	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
3	P	60	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,653	1,000	0,005	1,000	0,057	0,000	0,000	0,000	0,002	0,026	0,000	0,044		
4	P	90	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
5	P	120	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
6	P	150	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
7	P	180	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,033	1,000	0,328	0,000	0,001	0,002	0,015	0,161	0,001	0,257		
8	AP (1:1)	0	1,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,023	0,000	1,000	0,000	0,294	1,000	1,000	1,000	1,000	0,587	1,000	0,374		
9	AP (1:1)	30	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,017	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,007	1,000	0,211	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		
10	AP (1:1)	60	0,000	0,056	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000		0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,025	1,000	0,000	0,755	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001		
11	AP (1:1)	90	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
12	AP (1:1)	120	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,017	1,000	0,000		1,000	1,000	0,000	0,003	1,000	1,000	0,894	1,000	1,000	0,000	0,062	0,095	0,470	1,000	0,029	1,000		
13	AP (1:1)	150	0,000	0,013	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,006	1,000	0,000	0,207	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
14	AP (1:1)	180	0,000	0,399	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,191	1,000	0,001	1,000	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,011	
15	AP (2:1)	0	1,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,034	0,000	1,000	0,001	1,000	0,001	0,414	1,000	1,000	1,000	1,000	0,814	1,000	0,524	
16	AP (2:1)	30	1,000	0,628	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	1,000		0,001	1,000	0,045	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
17	AP (2:1)	60	0,036	1,000	0,653	0,000	0,000	0,000	1,000	0,023	1,000	0,025	0,000	1,000	0,006	0,191	0,034	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,022	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
18	AP (2:1)	90	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,007	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,001	1,000		0,433	1,000	1,000	0,000	0,027	0,042	0,221	1,000	0,012	1,000	1,000	
19	AP (2:1)	120	1,000	1,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,033	1,000	1,000	0,000	0,000	0,894	0,000	0,001	1,000	1,000	1,000	0,433		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
20	AP (2:1)	150	0,001	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,211	0,755	0,000	1,000	0,207	1,000	0,001	0,045	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,677	0,985	1,000	1,000	0,349	1,000	1,000	
21	AP (2:1)	180	0,433	1,000	0,057	0,000	0,000	0,000	0,328	0,294	1,000	0,002	0,000	1,000	0,000	0,014	0,414	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,283	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
22	A	0	1,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,022	0,000	1,000	0,000	0,283		1,000	1,000	1,000	0,565	1,000	0,360	1,000	
23	A	30	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	0,000	0,000	0,062	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,027	1,000	0,677	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
24	A	60	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,002	1,000	1,000	0,000	0,000	0,095	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,042	1,000	0,985	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
25	A	90	1,000	1,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,015	1,000	1,000	0,000	0,470	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,221	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	
26	A	120	0,851	1,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,161	0,587	1,000	0,001	0,000	1,000	0,000	0,006	0,814	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
27	A	150	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	0,349	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
28	A	180	0,548	1,000	0,044	0,000	0,000	0,000	0,257	0,374	1,000	0,001	0,000	1,000	0,000	0,011	0,524	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,360	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 12. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad fosfatasa**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Fosfatasa																															
Probabilities for Post Hoc Tests																															
Error: Between MS = 8779E2, df = 84,000																															
Cell No.	Tratamiento	días	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	
1	P	0	2525,0	5793,3	4781,5	4508,8	3602,0	2981,5	2498,0	5437,0	3526,3	4371,0	4793,5	3506,5	5608,5	5970,0	6738,0	5839,8	6098,8	5572,0	2592,3	3109,3	2893,8	2259,8	15530	5660,0	5893,5	4012,0	3758,3	1851,3	
2	P	30	0,002	0,002	0,383	1,000	1,000	1,000	0,012	1,000	1,000	0,361	1,000	0,005	0,001	0,000	0,001	0,000	0,006	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,003	0,001	1,000	1,000	1,000	
3	P	60	0,383	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,336	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,529	1,000	1,000	0,101	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,011	
4	P	90	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,397	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,049	
5	P	120	1,000	0,524	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,221	0,003	0,420	0,115	1,000	1,000	1,000	1,000	0,977	0,323	1,000	1,000	1,000	1,000	
6	P	150	1,000	0,021	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,142	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,058	0,008	0,000	0,016	0,004	0,070	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,044	0,012	1,000	1,000	
7	P	180	1,000	0,001	0,336	1,000	1,000	1,000	1,000	0,010	1,000	1,000	0,317	1,000	0,004	0,000	0,000	0,001	0,000	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,003	0,001	1,000	1,000	1,000	
8	AP (1:1)	0	0,012	1,000	1,000	1,000	1,000	0,142	0,010	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,018	0,270	0,090	0,003	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	
9	AP (1:1)	30	1,000	0,364	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,874	1,000	0,136	0,002	0,290	0,077	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,764	0,000	1,000	1,000	1,000	0,102	
10	AP (1:1)	60	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,764	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,102	
11	AP (1:1)	90	0,361	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,317	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	0,095	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,010	
12	AP (1:1)	120	1,000	0,331	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,798	0,136	0,002	0,263	0,070	0,944	1,000	1,000	1,000	1,000	0,627	0,201	1,000	1,000	1,000	1,000	
13	AP (1:1)	150	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	0,058	0,004	1,000	0,874	1,000	0,798	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,007	0,113	0,036	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	
14	AP (1:1)	180	0,001	1,000	1,000	1,000	0,221	0,008	0,000	1,000	0,151	1,000	0,136	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,016	0,005	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,475	0,000
15	AP (2:1)	0	0,000	1,000	1,000	0,437	0,003	0,000	0,000	1,000	0,002	0,222	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,034	0,008	0,000
16	AP (2:1)	30	0,001	1,000	1,000	1,000	0,420	0,016	0,001	1,000	0,290	1,000	1,000	0,263	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,002	0,033	0,010	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,877	0,000	
17	AP (2:1)	60	0,000	1,000	1,000	1,000	0,115	0,004	0,000	1,000	0,077	1,000	1,000	0,070	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,008	0,002	0,000	0,000	1,000	1,000	0,856	0,254	0,000	
18	AP (2:1)	90	0,006	1,000	1,000	1,000	1,000	0,070	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,008	0,137	0,044	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	
19	AP (2:1)	120	1,000	0,002	0,529	1,000	1,000	1,000	0,018	1,000	1,000	0,500	1,000	0,007	0,001	0,000	0,002	0,000	0,008	0,008	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,005	0,001	1,000	1,000	1,000	
20	AP (2:1)	150	1,000	0,043	1,000	1,000	1,000	1,000	0,270	1,000	1,000	1,000	1,000	0,113	0,016	0,000	0,033	0,008	0,137	1,000	1,000	1,000	1,000	0,087	0,025	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
21	AP (2:1)	180	1,000	0,013	1,000	1,000	1,000	1,000	0,090	1,000	1,000	1,000	1,000	0,036	0,005	0,000	0,010	0,002	0,044	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,027	0,007	1,000	1,000	1,000	1,000	
22	A	0	1,000	0,000	0,101	0,397	1,000	1,000	1,000	0,003	1,000	0,764	0,095	1,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	A	30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	A	60	0,003	1,000	1,000	1,000	0,977	0,044	0,003	1,000	0,688	1,000	1,000	0,627	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,005	0,087	0,027	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	
25	A	90	0,001	1,000	1,000	1,000	0,323	0,012	0,001	1,000	0,222	1,000	1,000	0,201	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	0,025	0,007	0,000	0,000	1,000	1,000	0,683	1,000	0,000	
26	A	120	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,034	1,000	0,856	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,606	
27	A	150	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,475	0,008	0,877	0,254	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,683	1,000	1,000	1,000	
28	A	180	1,000	0,000	0,011	0,049	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,102	0,010	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,606	1,000	1,000	

Tabla 13. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Macronutrientes**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **Nitrógeno**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = ,25492, df = 24,000

Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	P	0	1,8500	3,1583	6,3583	10,033	7,8611	14,300	10,867	13,967
2	P	180	0,034	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,792	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,792	0,000	0,000	0,000	0,000
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000

Bonferroni test; variable **Fósforo**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = ,04597, df = 24,000

Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	P	0	,49333	1,4900	3,5017	1,7467	4,5044	1,3033	6,5100	10,700
2	P	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,208	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	1,000	0,000	0,208	0,000	0,000	0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Bonferroni test; variable **Potasio**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = ,67232, df = 24,000

Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	P	0	10,560	33,000	12,052	16,957	12,549	16,033	13,543	20,683
2	P	180	0,000	0,000	0,468	0,000	0,061	0,000	0,001	0,000
3	AP (1:1)	0	0,468	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,468	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,061	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,007	0,007	0,000
7	A	0	0,001	0,000	0,468	0,000	1,000	0,007	0,000	0,000
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Bonferroni test; variable **Calcio**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = ,35182, df = 24,000

Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	P	0	3,5933	12,533	8,9467	24,473	10,731	10,027	14,300	40,200
2	P	180	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,000	0,000	0	0,007	0,000	0,009	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	0,007	0,008	0	0,000	1,000	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,465	0	1,000	0,000	0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,009	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000

Bonferroni test; variable **Magnesio**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = ,02945, df = 24,000

Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
1	P	0	,26000	1,5833	1,9983	1,6033	2,5778	2,2300	3,7367	5,3733
2	P	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,063	0,063	0,094	0,002	1,000	0,000	0,000
4	AP (1:1)	180	0,000	1,000	0,094	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,002	0,000	0,238	0,000	0,000	0,000
6	AP (2:1)	180	0,000	0,001	1,000	0,001	0,238	0,000	0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla 14. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Micronutrientes**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Hierro Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 29068,, df = 24,000											Bonferroni test; variable Manganeso Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3,2739, df = 24,000											
Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	
1	P	0		1,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	1	P	0		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
2	P	180	1,000		0,003	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	2	P	180	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	AP (1:1)	0	0,000	0,003		1,000	1,000	0,129	0,000	0,000	3	AP (1:1)	0	0,000	0,000		0,128	1,000	1,000	0,000	0,000	
4	AP (1:1)	180	0,001	0,012	1,000		0,595	0,031	0,000	0,000	4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,128		1,000	0,238	0,238	0,000	
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	1,000	0,595		1,000	0,026	0,000	5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	1,000	1,000		1,000	0,015	0,000	
6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,129	0,031	1,000		0,496	0,000	6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	1,000	0,238	1,000			0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,496		0,000	7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,238	0,015	0,000		0,000	
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Bonferroni test; variable Cobre Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,48633, df = 24,000											Bonferroni test; variable Zinc Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,84336, df = 24,000											
Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	Cell No.	Tratamiento	tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	
1	P	0	0,0000	8,0000	9,5333	7,3333	12,711	9,3333	19,067	33,833	1	P	0	0,0000	13,167	10,667	9,1667	14,222	8,0000	21,333	44,500	
2	P	180	0,000		0,134	1,000	0,000	0,347	0,000	0,000	2	P	180	0,000		0,022	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	
3	AP (1:1)	0	0,000	0,134		0,005	0,000	1,000	0,000	0,000	3	AP (1:1)	0	0,000	0,022		0,835	0,000	0,011	0,000	0,000	
4	AP (1:1)	180	0,000	1,000	0,005		0,000	0,013	0,000	0,000	4	AP (1:1)	180	0,000	0,000	0,835		0,000	1,000	0,000	0,000	
5	AP (2:1)	0	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	5	AP (2:1)	0	0,000	1,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	
6	AP (2:1)	180	0,000	0,347	1,000	0,013	0,000		0,000	0,000	6	AP (2:1)	180	0,000	0,000	0,011	1,000	0,000			0,000	0,000
7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	7	A	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	
8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		8	A	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

Tabla 15. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Peso seco parte aérea-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Parte aérea, peso seco																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .03448, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	.94667	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,132	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
2	S	FQ	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,003	0,465	1,000	0,002	0,465	1,000
3	S	FB	1,000	0,000		0,519	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000
4	SA	NF	1,000	0,000	0,519		1,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		0,132	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,000	1,000	0,006	0,132		1,000	0,000	0,000	1,000	0,009	0,000	1,000	0,009	0,003
7	SAP	NF	0,132	0,000	1,000	0,000	0,009	1,000		0,007	0,006	1,000	0,132	0,002	1,000	0,132	0,045
8	SAP	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007		1,000	0,648	1,000	1,000	0,580	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	1,000		0,580	1,000	1,000	0,519	1,000	1,000
10	SAPE	NF	0,001	0,003	0,019	0,000	0,000	1,000	1,000	0,648	0,580		1,000	0,235	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,000	0,465	0,000	0,000	0,000	0,009	0,132	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	1,000	1,000	0,235	1,000		0,210	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,001	0,002	0,022	0,000	0,000	1,000	1,000	0,580	0,519	1,000	1,000	0,210		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,465	0,000	0,000	0,000	0,009	0,132	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,045	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 16. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Peso seco raíces-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Peso seco raíz																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .43436, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	1,3867	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,110	1,000	0,004	0,322	0,000	0,073	0,002	0,001
2	S	FQ	0,000		0,001	0,000	0,000	0,002	0,002	1,000	0,016	1,000	0,587	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	0,001		1,000	1,000	1,000	1,000	0,875	1,000	0,040	1,000	0,001	0,605	0,016	0,013
4	SA	NF	1,000	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,022	1,000	0,001	0,069	0,000	0,015	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,163	1,000	0,006	0,471	0,000	0,110	0,002	0,002
6	SA	FB	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,093	1,000	0,002	1,000	0,037	0,030
7	SAP	NF	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,096	1,000	0,002	1,000	0,039	0,031
8	SAP	FQ	0,110	1,000	0,875	0,022	0,163	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	0,016	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000		0,685	1,000	0,018	1,000	0,292
10	SAE	NF	0,004	1,000	0,040	0,001	0,006	0,093	0,096	1,000	0,685		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,322	0,587	1,000	0,069	0,471	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,624	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,000	1,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,002	1,000	0,018	1,000	0,624		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,073	1,000	0,605	0,015	0,110	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,002	1,000	0,016	0,000	0,002	0,037	0,039	1,000	0,292	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,001	1,000	0,013	0,000	0,002	0,030	0,031	1,000	0,241	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 17. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Nódulos-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Nódulos																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 515.53, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	(1) 64.000	(2) 99.667	(3) 69.000	(4) 29.000	(5) 33.000	(6) 69.000	(7) 107.00	(8) 134.33	(9) 94.000	(10) 140.67	(11) 194.00	(12) 128.00	(13) 158.00	(14) 249.00	(15) 138.00
1	S	NF		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,070	1,000	0,028	0,000	0,176	0,002	0,000	0,041
2	S	FQ	1,000		1,000	0,067	0,120	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,002	1,000	0,390	0,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,145	1,000	0,058	0,000	0,356	0,004	0,000	0,086
4	SA	NF	1,000	0,067	1,000		1,000	1,000	0,023	0,000	0,153	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,120	1,000	1,000		1,000	0,041	0,001	0,269	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,145	1,000	0,058	0,000	0,356	0,004	0,000	0,086
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	0,023	0,041	1,000		1,000	1,000	1,000	0,006	1,000	1,000	0,000	1,000
8	SAP	FQ	0,070	1,000	0,145	0,000	0,001	0,145	1,000		1,000	1,000	0,324	1,000	1,000	0,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	1,000	1,000	0,153	0,269	1,000	1,000	1,000		1,000	0,001	1,000	0,176	0,000	1,000
10	SAE	NF	0,028	1,000	0,058	0,000	0,000	0,058	1,000	1,000	1,000		0,769	1,000	1,000	0,000	1,000
11	SAE	FQ	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,324	0,001	0,769		0,132	1,000	0,615	0,537
12	SAE	FB	0,176	1,000	0,356	0,001	0,002	0,356	1,000	1,000	1,000	1,000	0,132		1,000	0,000	1,000
13	SAPE	NF	0,002	0,390	0,004	0,000	0,000	0,004	1,000	1,000	0,176	1,000	1,000	1,000		0,003	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,615	0,000	0,003		0,000
15	SAPE	FB	0,041	1,000	0,086	0,000	0,000	0,086	1,000	1,000	1,000	1,000	0,537	1,000	1,000	0,000	

Tabla 18. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Frecuencia micorrización-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Frecuencia micorrización																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 37.147, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	(1) 99.067	(2) 97.223	(3) 100.00	(4) 97.223	(5) 94.443	(6) 98.147	(7) 93.490	(8) 100.00	(9) 100.00	(10) 90.738	(11) 81.482	(12) 98.607	(13) 94.443	(14) 94.360	(15) 100.00
1	S	NF		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,142	1,000	1,000	1,000	1,000
2	S	FQ	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,374	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,086	1,000	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,374	1,000	1,000	1,000	1,000
5	SA	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,231	1,000	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,086	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,086	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,142	0,374	0,086	0,374	1,000	0,231	1,000	0,086	0,086	1,000		0,181	1,000	1,000	0,086
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,181		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,086	1,000	1,000	1,000	

Tabla 19. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Corteza micorrizada-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **Raiz micorrizada**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = 19.621, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		0,000	0,000	0,001	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,002	0,020
2	S	FQ	0,000		0,000	0,875	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,469	0,000
3	S	FB	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
4	SA	NF	0,001	0,875	0,000		1,000	0,000	0,627	0,435	0,039	1,000	0,583	0,003	1,000	1,000	0,000
5	SA	FQ	0,000	1,000	0,000	1,000		0,000	1,000	0,008	0,001	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,004	0,053	0,000	0,000	0,622	0,000	0,000	1,000
7	SAP	NF	0,000	1,000	0,000	0,627	1,000	0,000		0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,332	0,000
8	SAP	FQ	1,000	0,000	0,000	0,435	0,008	0,004	0,000		1,000	0,036	0,000	1,000	0,037	0,813	0,000
9	SAP	FB	1,000	0,000	0,000	0,039	0,001	0,053	0,000	1,000		0,003	0,000	1,000	0,003	0,078	0,000
10	SAE	NF	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,036	0,003		1,000	0,000	1,000	1,000	0,000
11	SAE	FQ	0,000	1,000	0,000	0,583	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000		0,000	1,000	0,308	0,000
12	SAE	FB	1,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,622	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000		0,000	0,006	0,006
13	SAPE	NF	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,037	0,003	1,000	1,000	0,000		1,000	0,000
14	SAPE	FQ	0,002	0,469	0,000	1,000	1,000	0,000	0,332	0,813	0,078	1,000	0,308	0,006	1,000		0,000
15	SAPE	FB	0,020	0,000	0,017	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	

Tabla 20. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **pH-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **pH**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = .00492, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,214	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2	S	FQ	1,000		1,000	1,000	1,000	0,291	1,000	0,024	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,338	1,000	0,099	1,000	0,250	0,816	0,033
4	SA	NF	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,338	1,000	0,816	1,000	0,116
5	SA	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000		0,528	1,000	0,045	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	1,000	0,291	1,000	1,000	0,528		1,000	1,000	0,038	0,158	0,010	1,000	0,028	0,099	0,003
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,392	1,000	0,116	1,000	0,291	0,941	0,038
8	SAP	FQ	0,214	0,024	1,000	1,000	0,045	1,000	1,000		0,003	0,012	0,001	0,338	0,002	0,008	0,000
9	SAP	FB	1,000	1,000	0,338	1,000	1,000	0,038	0,392	0,003		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,158	1,000	0,012	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	1,000	1,000	0,099	0,338	1,000	0,010	0,116	0,001	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,338	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	1,000	1,000	0,250	0,816	1,000	0,028	0,291	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	0,816	1,000	1,000	0,099	0,941	0,008	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	0,033	0,116	1,000	0,003	0,038	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 21. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **CE-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable CE																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .00038, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	.18067	.19333	.19967	.27667	.31700	.20867	.20267	.19833	.22567	.21600	.20700	.21633	.17533	.16633	.21000
2	S	FQ	1,000	1,000	1,000	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,004	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	0,000	0,001	0,004		1,000	0,019	0,007	0,003	0,343	0,069	0,015	0,073	0,000	0,000	0,024
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	1,000	1,000	0,019	0,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	0,007	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	0,003	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,884	1,000	1,000	0,343	0,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,382	0,086	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	0,069	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,425	1,000
11	SAE	FQ	1,000	1,000	1,000	0,015	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	0,073	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,403	1,000
13	SAPE	NF	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,382	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,086	0,425	1,000	0,403	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	1,000	0,024	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 22. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Nitrógeno-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Nitrógeno planta																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 1.3557, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	14.433	14.551	13.854	9.5222	10.501	11.692	12.237	13.571	13.990	15.623	17.118	15.688	14.586	12.969	14.348
2	S	FQ	1,000		1,000	0,001	0,020	0,555	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,009	0,144	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,185	1,000	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	0,002	0,001	0,009		1,000	1,000	0,812	0,020	0,006	0,000	0,000	0,000	0,001	0,111	0,002
5	SA	FQ	0,028	0,020	0,144	1,000		1,000	1,000	0,315	0,098	0,001	0,000	0,001	0,018	1,000	0,035
6	SA	FB	0,757	0,555	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,028	0,000	0,023	0,506	1,000	0,944
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	0,812	1,000	1,000		1,000	1,000	0,131	0,002	0,110	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	0,020	0,315	1,000	1,000		1,000	1,000	0,083	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	1,000	1,000	0,006	0,098	1,000	1,000	1,000		1,000	0,269	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	0,000	0,001	0,028	0,131	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,948	1,000
11	SAE	FQ	0,876	1,000	0,185	0,000	0,000	0,000	0,002	0,083	0,269	1,000		1,000	1,000	0,015	0,702
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	0,000	0,001	0,023	0,110	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,802	1,000
13	SAPE	NF	1,000	1,000	1,000	0,001	0,018	0,506	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	1,000	0,111	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,948	0,015	0,802	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	1,000	0,002	0,035	0,944	1,000	1,000	1,000	1,000	0,702	1,000	1,000	1,000	

Tabla 23. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Nitrógeno-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **Nitrógeno extracción**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = 9.4576, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	13.653	36.245	14.931	5.9942	8.3427	15.702	18.146	29.795	30.597	25.322	32.561	34.044	25.344	26.414	29.786
2	S	FQ	0,000	0,000	1,000	0,499	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,006	0,002	0,000
3	S	FB	1,000	0,000		0,133	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,027	0,000	0,000	0,027	0,008	0,000
4	SA	NF	0,499	0,000	0,133		1,000	0,058	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		0,673	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,000	1,000	0,058	0,673		1,000	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,062	0,019	0,000
7	SAP	NF	1,000	0,000	1,000	0,004	0,052	1,000		0,007	0,003	0,807	0,000	0,000	0,789	0,267	0,007
8	SAP	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	0,007	0,015	0,027	0,000	0,000	0,064	0,807	1,000	1,000		0,758	0,166	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,758		1,000	0,774	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,166	1,000		0,170	0,513	1,000
13	SAPE	NF	0,006	0,016	0,027	0,000	0,000	0,062	0,789	1,000	1,000	1,000	0,774	0,170		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,002	0,051	0,008	0,000	0,000	0,019	0,267	1,000	1,000	1,000	1,000	0,513	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 24. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Fósforo-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable **Fósforo planta**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = .07844, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	1.9441	2.7453	2.0204	1.7660	2.6182	2.6945	2.4147	2.7962	3.8519	2.6892	2.8089	2.6054	2.7326	3.7883	3.2541
2	S	FQ	0,153		0,367	0,018	1,000	1,000	1,000	1,000	0,004	1,000	1,000	1,000	1,000	0,008	1,000
3	S	FB	1,000	0,367		1,000	1,000	0,645	1,000	0,206	0,000	0,684	0,178	1,000	0,423	0,000	0,001
4	SA	NF	1,000	0,018	1,000		0,085	0,034	0,850	0,010	0,000	0,036	0,008	0,098	0,021	0,000	0,000
5	SA	FQ	0,645	1,000	1,000	0,085		1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,002	0,974
6	SA	FB	0,275	1,000	0,645	0,034	1,000		1,000	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000	0,005	1,000
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	0,850	1,000	1,000		1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,098
8	SAP	FQ	0,085	1,000	0,206	0,010	1,000	1,000	1,000		0,007	1,000	1,000	1,000	1,000	0,016	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,004	0,000	0,000	0,001	0,002	0,000	0,007		0,002	0,008	0,001	0,003	1,000	1,000
10	SAE	NF	0,292	1,000	0,684	0,036	1,000	1,000	1,000	1,000	0,002		1,000	1,000	1,000	0,004	1,000
11	SAE	FQ	0,073	1,000	0,178	0,008	1,000	1,000	1,000	1,000	0,008	1,000		1,000	1,000	0,018	1,000
12	SAE	FB	0,741	1,000	1,000	0,098	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	1,000		1,000	0,002	0,850
13	SAPE	NF	0,178	1,000	0,423	0,021	1,000	1,000	1,000	1,000	0,003	1,000	1,000	1,000		0,007	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,008	0,000	0,000	0,002	0,005	0,000	0,016	1,000	0,004	0,018	0,002	0,007		1,000
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,001	0,000	0,974	1,000	0,098	1,000	1,000	1,000	1,000	0,850	1,000	1,000	

Tabla 25. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Fósforo-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Fósforo extracción																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .62084, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			1.8424	6.8588	2.2054	1.1257	2.1034	3.5844	3.5887	6.1497	8.4016	4.7328	5.6949	5.8781	4.7487	7.6109	6.8245
1	S	NF		0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000
2	S	FQ	0,000		0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	1,000	1,000	0,259	1,000	1,000	0,277	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	0,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,049	0,001	0,000	0,046	0,000	0,000
4	SA	NF	1,000	0,000	1,000		1,000	0,065	0,064	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,002	1,000	0,065	1,000		1,000	0,042	0,000	1,000	0,276	0,130	1,000	0,000	0,002
7	SAP	NF	1,000	0,002	1,000	0,064	1,000	1,000		0,042	0,000	1,000	0,281	0,133	1,000	0,000	0,002
8	SAP	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,042	0,042		0,155	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,155		0,000	0,023	0,050	0,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	0,010	0,259	0,049	0,000	0,032	1,000	1,000	1,000	0,000		1,000	1,000	1,000	0,011	0,298
11	SAE	FQ	0,000	1,000	0,001	0,000	0,000	0,276	0,281	1,000	0,023	1,000		1,000	1,000	0,598	1,000
12	SAE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,130	0,133	1,000	0,050	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,010	0,277	0,046	0,000	0,029	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000		0,012	0,318
14	SAPE	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,011	0,598	1,000	0,012		1,000
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	1,000	1,000	0,298	1,000	1,000	0,318	1,000	

Tabla 26. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **P ABDTPA- SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable P-DTPA																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .80780, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			2.7787	7.7240	2.6007	10.083	15.941	9.3300	11.742	17.205	15.283	11.937	11.735	15.909	14.873	19.922	8.2907
1	S	NF		0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	S	FQ	0,000		0,000	0,328	0,000	1,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	1,000
3	S	FB	1,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	0,000	0,328	0,000		0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	1,000	1,000	0,001	0,000	1,000	1,000	0,001	0,000
6	SA	FB	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000		0,272	0,000	0,000	0,135	0,279	0,000	0,000	0,000	1,000
7	SAP	NF	0,000	0,001	0,000	1,000	0,000	0,272		0,000	0,004	1,000	1,000	0,000	0,019	0,000	0,006
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	1,000	0,360	0,090	0,000
9	SAP	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,004	1,000		0,008	0,004	1,000	1,000	0,000	0,000
10	SAE	NF	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001	0,135	1,000	0,000	0,008		1,000	0,001	0,040	0,000	0,003
11	SAE	FQ	0,000	0,001	0,000	1,000	0,000	0,279	1,000	0,000	0,004	1,000		0,000	0,019	0,000	0,006
12	SAE	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,001	0,000		1,000	0,001	0,000
13	SAPE	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,019	0,360	1,000	0,040	0,019	1,000		0,000	0,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,090	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000		0,000
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,006	0,000	0,000	0,003	0,006	0,000	0,000	0,000	

Tabla 27. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Potasio-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Potasio planta																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 2.6881, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		1,000	1,000	1,000	1,000	0,143	1,000	1,000	1,000	1,000	0,011	1,000	1,000	1,000	1,000
2	S	FQ	1,000		1,000	1,000	1,000	0,024	0,229	1,000	0,686	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		1,000	1,000	0,005	0,051	0,630	0,163	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	1,000	1,000	1,000		0,471	0,000	0,003	0,042	0,010	0,292	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000
5	SA	FQ	1,000	1,000	1,000	0,471		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,108	1,000	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	0,143	0,024	0,005	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,471	0,079	0,018	0,370
7	SAP	NF	1,000	0,229	0,051	0,003	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,705	0,179	1,000
8	SAP	FQ	1,000	1,000	0,630	0,042	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	0,686	0,163	0,010	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,543	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	0,292	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,177	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,011	0,002	0,000	0,000	0,108	1,000	1,000	1,000	1,000	0,177		0,039	0,006	0,001	0,030
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,471	1,000	1,000	1,000	1,000	0,039		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,079	0,705	1,000	1,000	1,000	1,000	0,006	1,000		1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,018	0,179	1,000	0,543	1,000	0,001	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,370	1,000	1,000	1,000	1,000	0,030	1,000	1,000	1,000	

Tabla 28. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Potasio-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Potasio extracción																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 28.623, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		0,000	1,000	1,000	1,000	0,151	0,026	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,038	0,002	0,000
2	S	FQ	0,000		0,000	0,000	0,000	0,026	0,149	1,000	1,000	0,518	1,000	1,000	0,104	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	0,000		1,000	1,000	0,364	0,066	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,094	0,005	0,000
4	SA	NF	1,000	0,000	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		0,031	0,005	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000
6	SA	FB	0,151	0,026	0,364	0,000	0,031		1,000	0,025	0,008	1,000	0,002	0,110	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	0,026	0,149	0,066	0,000	0,005	1,000		0,145	0,051	1,000	0,015	0,594	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,145		1,000	0,502	1,000	1,000	0,101	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,051	1,000		0,183	1,000	1,000	0,035	0,628	1,000
10	SAE	NF	0,007	0,518	0,017	0,000	0,001	1,000	1,000	0,502	0,183		0,056	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,015	1,000	1,000	0,056		1,000	0,010	0,201	1,000
12	SAE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,110	0,594	1,000	1,000	1,000	1,000		0,423	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,038	0,104	0,094	0,000	0,008	1,000	1,000	0,101	0,035	1,000	0,010	0,423		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,002	1,000	0,005	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,628	1,000	0,201	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 29. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **K ABDTPA-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable K-DTPA																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 22.539, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			23.053	30.187	31.307	125.45	158.67	102.05	63.407	81.227	43.347	57.827	68.827	49.567	30.047	39.993	79.540
1	S	NF		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	1,000	0,014	0,000
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,205	0,000	0,000	0,002	1,000	1,000	0,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,433	0,000	0,000	0,006	1,000	1,000	0,000
4	SA	NF	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,008	0,001	1,000	1,000	0,129	0,000	0,000	0,026
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,008		0,000	0,000	0,341	0,000	0,000	0,000	1,000
9	SAP	FB	0,001	0,205	0,433	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000		0,082	0,000	1,000	0,186	1,000	0,000
10	SAE	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,082		0,847	1,000	0,000	0,008	0,000
11	SAE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,341	0,000	0,847		0,003	0,000	0,000	1,000
12	SAE	FB	0,000	0,002	0,006	0,000	0,000	0,000	0,129	0,000	1,000	1,000	0,003		0,002	1,000	0,000
13	SAPE	NF	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,186	0,000	0,000	0,002		1,000	0,000
14	SAPE	FQ	0,014	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,008	0,000	1,000	1,000		0,000
15	SAPE	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	

Tabla 30. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Hierro-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Hierro planta																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 160.93, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			116.49	124.23	249.97	117.21	105.87	102.54	86.872	89.949	125.36	88.333	126.41	71.949	94.974	106.92	102.28
1	S	NF		1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,804	1,000	1,000	1,000	1,000	0,017	1,000	1,000	1,000
2	S	FQ	1,000		0,000	1,000	1,000	1,000	0,117	0,256	1,000	0,170	1,000	0,002	0,875	1,000	1,000
3	S	FB	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	1,000	1,000	0,000		1,000	1,000	0,677	1,000	1,000	0,959	1,000	0,014	1,000	1,000	1,000
5	SA	FQ	1,000	1,000	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,280	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,636	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	0,804	0,117	0,000	0,677	1,000	1,000		1,000	0,087	1,000	0,066	1,000	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	1,000	0,256	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,192	1,000	0,147	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,087	0,192		0,127	1,000	0,002	0,669	1,000	1,000
10	SAE	NF	1,000	0,170	0,000	0,959	1,000	1,000	1,000	1,000	0,127		0,097	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,066	0,147	1,000	0,097		0,001	0,518	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,017	0,002	0,000	0,014	0,280	0,636	1,000	1,000	0,002	1,000	0,001		1,000	0,215	0,677
13	SAPE	NF	1,000	0,875	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,669	1,000	0,518	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,215	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,677	1,000	1,000	

Tabla 31. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Manganeso-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Manganeso planta																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 8.6429, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,167	0,145	0,000	0,000	0,000	0,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,698	0,611	0,002	0,000	0,000	0,002
4	SA	NF	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,983	0,002	0,000	0,000	0,006	0,293	0,520	0,006
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,983		1,000	0,027	0,031	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,001	0,005	0,000	0,000	0,000	0,002	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	0,023	0,167	0,698	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	1,000		1,000	1,000	0,100	0,054	1,000
11	SAE	FQ	0,020	0,145	0,611	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	1,000	1,000		1,000	0,115	0,063	1,000
12	SAE	FB	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,006	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,293	1,000	1,000	1,000	0,100	0,115	1,000		1,000
14	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,520	1,000	1,000	0,054	0,063	1,000	1,000		1,000
15	SAP	FB	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,006	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 32. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Cobre-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Cobre planta																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 1.0264, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF	6.3333	6.5128	7.6154	4.8462	3.4359	6.4103	6.7949	6.7172	6.1026	10.128	8.0256	6.8462	7.8154	6.6667	9.7436
2	S	FQ	1,000		1,000	1,000	0,154	1,000	1,000	1,000	1,000	0,008	1,000	1,000	1,000	1,000	0,029
3	S	FB	1,000	1,000		0,232	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000	0,515	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	1,000	1,000	0,232		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,062	1,000	0,122	1,000	0,000
5	SA	FQ	0,154	0,086	0,002	1,000		0,120	0,034	0,044	0,320	0,000	0,001	0,029	0,001	0,052	0,000
6	SA	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	0,120		1,000	1,000	1,000	0,010	1,000	1,000	1,000	1,000	0,037
7	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	0,034	1,000		1,000	1,000	0,037	1,000	1,000	1,000	1,000	0,131
8	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	0,044	1,000	1,000		1,000	0,029	1,000	1,000	1,000	1,000	0,101
9	SAP	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	0,320	1,000	1,000	1,000		0,004	1,000	1,000	1,000	1,000	0,013
10	SAE	NF	0,008	0,014	0,515	0,000	0,000	0,010	0,037	0,029	0,004		1,000	0,044	0,939	0,024	1,000
11	SAE	FQ	1,000	1,000	1,000	0,062	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,154
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	0,029	1,000	1,000	1,000	1,000	0,044	1,000		1,000	1,000	0,154
13	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	0,122	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,939	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	0,052	1,000	1,000	1,000	1,000	0,024	1,000	1,000	1,000		0,086
15	SAP	FB	0,029	0,052	1,000	0,000	0,000	0,037	0,131	0,101	0,013	1,000	1,000	0,154	1,000	0,086	

Tabla 33. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Zinc-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Zn planta																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 8.9866, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			23.769	25.154	16.462	20.821	14.974	21.974	16.026	25.333	36.846	26.667	25.846	27.308	21.308	24.308	36.231
1	S	NF		1,000	0,587	1,000	0,121	1,000	0,373	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,002
2	S	FQ	1,000		0,135	1,000	0,026	1,000	0,084	1,000	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,009
3	S	FB	0,587	0,135		1,000	1,000	1,000	1,000	0,111	0,000	0,025	0,063	0,012	1,000	0,335	0,000
4	SA	NF	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
5	SA	FQ	0,121	0,026	1,000	1,000		0,802	1,000	0,021	0,000	0,005	0,012	0,002	1,000	0,067	0,000
6	SA	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	0,802		1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000
7	SAP	NF	0,373	0,084	1,000	1,000	1,000	1,000		0,069	0,000	0,015	0,039	0,007	1,000	0,211	0,000
8	SAP	FQ	1,000	1,000	0,111	1,000	0,021	1,000	0,069		0,006	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,011
9	SAP	FB	0,001	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006		0,026	0,010	0,053	0,000	0,002	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	0,025	1,000	0,005	1,000	0,015	1,000	0,026		1,000	1,000	1,000	1,000	0,052
11	SAE	FQ	1,000	1,000	0,063	1,000	0,012	1,000	0,039	1,000	0,010	1,000		1,000	1,000	1,000	0,020
12	SAE	FB	1,000	1,000	0,012	1,000	0,002	1,000	0,007	1,000	0,053	1,000	1,000		1,000	1,000	0,105
13	SAPE	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	0,335	1,000	0,067	1,000	0,211	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000	1,000		0,004
15	SAPE	FB	0,002	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	1,000	0,052	0,020	0,105	0,000	0,004	

Tabla 34. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Hierro-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa.

Bonferroni test; variable Hierro extracción																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 565.30, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			110.43	309.95	272.82	74.531	84.518	137.12	130.11	196.89	271.95	153.11	254.21	162.68	165.23	214.96	212.80
1	S	NF		0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,011	0,000	1,000	0,000	1,000	0,880	0,001	0,001
2	S	FQ	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,780	0,000	0,000	0,003	0,002
3	S	FB	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	1,000	0,000	1,000	0,000	0,001	0,594	0,449
4	SA	NF	1,000	0,000	0,000		1,000	0,320	0,797	0,000	0,000	0,035	0,000	0,009	0,006	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	0,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,142	0,000	0,037	0,026	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,000	0,000	0,320	1,000		1,000	0,464	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,039	0,053
7	SAP	NF	1,000	0,000	0,000	0,797	1,000	1,000		0,182	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,014	0,020
8	SAP	FQ	0,011	0,000	0,051	0,000	0,000	0,464	0,182		0,058	1,000	0,637	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,058		0,000	1,000	0,000	0,001	0,665	0,503
10	SAE	NF	1,000	0,000	0,000	0,035	0,142	1,000	1,000	1,000	0,000		0,001	1,000	1,000	0,352	0,468
11	SAE	FQ	0,000	0,780	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,637	1,000	0,001		0,005	0,008	1,000	1,000
12	SAE	FB	1,000	0,000	0,000	0,009	0,037	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,005		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,880	0,000	0,001	0,006	0,026	1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	0,008	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,001	0,003	0,594	0,000	0,000	0,039	0,014	1,000	0,665	0,352	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,001	0,002	0,449	0,000	0,000	0,053	0,020	1,000	0,503	0,468	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 34. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Hierro-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Hierro extracción																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 565.30, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,011	0,000	1,000	0,000	1,000	0,880	0,001	0,001
2	S	FQ	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,780	0,000	0,000	0,003	0,002
3	S	FB	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	1,000	0,000	1,000	0,000	0,001	0,594	0,449
4	SA	NF	1,000	0,000	0,000		1,000	0,320	0,797	0,000	0,000	0,035	0,000	0,009	0,006	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	0,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,142	0,000	0,037	0,026	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,000	0,000	0,320	1,000		1,000	0,464	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,039	0,053
7	SAP	NF	1,000	0,000	0,000	0,797	1,000	1,000		0,182	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,014	0,020
8	SAP	FQ	0,011	0,000	0,051	0,000	0,000	0,464	0,182		0,058	1,000	0,637	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,058	0,000		0,000	1,000	0,000	0,001	0,665	0,503
10	SAE	NF	1,000	0,000	0,000	0,035	0,142	1,000	1,000	1,000	0,000		0,001	1,000	1,000	0,352	0,468
11	SAE	FQ	0,000	0,780	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,637	1,000	0,001		0,005	0,008	1,000	1,000
12	SAE	FB	1,000	0,000	0,000	0,009	0,037	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,005		1,000	1,000	1,000
13	SAP	NF	0,880	0,000	0,001	0,006	0,026	1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	0,008	1,000		1,000	1,000
14	SAP	FQ	0,001	0,003	0,594	0,000	0,000	0,039	0,014	1,000	0,665	0,352	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAP	FB	0,001	0,002	0,449	0,000	0,000	0,053	0,020	1,000	0,503	0,468	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 35. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Fe ABDTPA-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Fe-DTPA																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 14.330, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,001	1,000
2	S	FQ	0,000		0,249	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
3	S	FB	1,000	0,249		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,001
4	SA	NF	0,000	0,000	0,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	1,000	0,004	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,063
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,922	0,001
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000		0,002	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,028
9	SAP	FB	1,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,004	0,000	0,002		0,000	0,000	1,000	0,000	0,075	1,000
10	SAE	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000		1,000	0,000	1,000	1,000	0,003
11	SAE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000		0,000	1,000	0,245	0,000
12	SAE	FB	1,000	0,001	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,220
13	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000		1,000	0,003
14	SAP	FQ	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,922	1,000	0,075	1,000	0,245	0,000	1,000		1,000
15	SAP	FB	1,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,063	0,001	0,028	1,000	0,003	0,000	0,220	0,003	1,000	

Tabla 36. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Manganeso-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Manganeso extracción																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 63.147, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			16.328	47.424	22.174	46.761	60.021	80.037	65.445	81.194	69.772	47.382	55.714	73.483	62.326	73.866	68.385
1	S	NF		0,004	1,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	S	FQ	0,004		0,054	1,000	1,000	0,002	0,982	0,001	0,180	1,000	1,000	0,038	1,000	0,033	0,314
3	S	FB	1,000	0,054		0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	0,006	1,000	0,071		1,000	0,002	0,764	0,001	0,137	1,000	1,000	0,029	1,000	0,025	0,241
5	SA	FQ	0,000	1,000	0,000	1,000		0,456	1,000	0,289	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	0,000	0,002	0,000	0,002	0,456		1,000	1,000	1,000	0,002	0,080	1,000	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	0,000	0,982	0,000	0,764	1,000	1,000		1,000	1,000	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	0,000	0,001	0,000	0,001	0,289	1,000	1,000		1,000	0,001	0,049	1,000	0,712	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,180	0,000	0,137	1,000	1,000	1,000	1,000		0,177	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	0,004	1,000	0,055	1,000	1,000	0,002	0,967	0,001	0,177		1,000	0,038	1,000	0,032	0,309
11	SAE	FQ	0,000	1,000	0,002	1,000	1,000	0,080	1,000	0,049	1,000	1,000		1,000	1,000	0,935	1,000
12	SAE	FB	0,000	0,038	0,000	0,029	1,000	1,000	1,000	1,000	0,038	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,712	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,033	0,000	0,025	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,032	0,935	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,000	0,314	0,000	0,241	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,309	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 37. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Mn ABDTPA-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Mn-DTPA																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .80588, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			5.5567	5.2180	4.7227	9.2547	9.0560	9.8400	10.289	10.426	9.8796	9.0000	9.2333	7.7147	10.801	12.001	8.9113
1	S	NF		1,000	1,000	0,002	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,002	0,651	0,000	0,000	0,008
2	S	FQ	1,000		1,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,199	0,000	0,000	0,002
3	S	FB	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	0,002	0,001	0,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,080	1,000
5	SA	FQ	0,005	0,001	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,038	1,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,727	1,000	0,645	1,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,150	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,091	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,636	1,000	0,737	1,000
10	SAE	NF	0,006	0,002	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,031	1,000
11	SAE	FQ	0,002	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,074	1,000
12	SAE	FB	0,651	0,199	0,032	1,000	1,000	0,727	0,150	0,091	0,636	1,000	1,000		0,022	0,000	1,000
13	SAPE	NF	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,022		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,080	0,038	0,645	1,000	1,000	0,737	0,031	0,074	0,000	1,000		0,022
15	SAPE	FB	0,008	0,002	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,022	

Tabla 38. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Cobre-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable **Cobre extracción**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = 5.7234, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			6.0031	16.300	8.4123	3.0682	2.7308	8.5713	10.067	14.702	13.229	17.550	16.345	15.434	13.643	13.491	20.293
1	S	NF		0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,011	0,091	0,000	0,001	0,004	0,051	0,063	0,000
2	S	FQ	0,001		0,036	0,000	0,000	0,045	0,348	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	0,036		1,000	0,711	1,000	1,000	0,323	1,000	0,006	0,034	0,120	1,000	1,000	0,000
4	SA	NF	1,000	0,000	1,000		1,000	0,891	0,124	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	0,711	1,000		0,580	0,078	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
6	SA	FB	1,000	0,045	1,000	0,891	0,580		1,000	0,398	1,000	0,008	0,042	0,150	1,000	1,000	0,000
7	SAP	NF	1,000	0,348	1,000	0,124	0,078	1,000		1,000	1,000	0,064	0,328	1,000	1,000	1,000	0,001
8	SAP	FQ	0,011	1,000	0,323	0,000	0,000	0,398	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,797
9	SAP	FB	0,091	1,000	1,000	0,001	0,001	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,114
10	SAE	NF	0,000	1,000	0,006	0,000	0,000	0,008	0,064	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,001	1,000	0,034	0,000	0,000	0,042	0,328	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,004	1,000	0,120	0,000	0,000	0,150	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,051	1,000	1,000	0,001	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,200
14	SAPE	FQ	0,063	1,000	1,000	0,001	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,162
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,797	0,114	1,000	1,000	1,000	0,200	0,162	

Tabla 39. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Cu ABDTPA-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable **Cu-DTPA**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = .05829, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			1.6740	1.8073	1.7160	2.3207	2.2273	2.0027	2.3707	2.3820	2.2100	2.0087	2.2660	1.9480	2.4407	2.4780	2.0907
1	S	NF		1,000	1,000	0,276	0,914	1,000	0,142	0,122	1,000	1,000	0,562	1,000	0,054	0,032	1,000
2	S	FQ	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,807	0,700	1,000	1,000	1,000	0,329	0,201	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,478	1,000	1,000	0,249	0,214	1,000	1,000	0,953	1,000	0,097	0,058	1,000
4	SA	NF	0,276	1,000	0,478		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
5	SA	FQ	0,914	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	0,142	0,807	0,249	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	0,122	0,700	0,214	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,562	1,000	0,953	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,054	0,329	0,097	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,032	0,201	0,058	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 40. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Extracción Zinc-ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Zn-extracción
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = 51.114, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,042	0,002	0,000	1,000	0,008	0,000
2	S	FQ	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,581	0,628	1,000	1,000	0,013	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	0,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,278	0,001	0,000
4	SA	NF	1,000	0,000	1,000		1,000	0,974	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,000	0,000
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		0,544	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,000	1,000	0,974	0,544		1,000	0,010	0,000	0,970	0,047	0,001	1,000	0,210	0,000
7	SAP	NF	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,001	0,000	0,083	0,003	0,000	1,000	0,016	0,000
8	SAP	FQ	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,001		0,022	1,000	1,000	1,000	0,357	1,000	0,201
9	SAP	FB	0,000	0,581	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022		0,000	0,004	0,303	0,000	0,001	1,000
10	SAE	NF	0,042	0,628	0,005	0,000	0,000	0,970	0,083	1,000	0,000		1,000	1,000	1,000	1,000	0,002
11	SAE	FQ	0,002	1,000	0,000	0,000	0,000	0,047	0,003	1,000	0,004	1,000		1,000	1,000	1,000	0,043
12	SAE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	1,000	0,303	1,000	1,000		0,026	1,000	1,000
13	SAPE	NF	1,000	0,013	0,278	0,029	0,015	1,000	1,000	0,357	0,000	1,000	1,000	0,026		1,000	0,000
14	SAPE	FQ	0,008	1,000	0,001	0,000	0,000	0,210	0,016	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000		0,009
15	SAPE	FB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,201	1,000	0,002	0,043	1,000	0,000	0,009	

Tabla 41. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **ZN ABDTPA-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Zn-DTPA
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = .02626, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,382	0,252	0,008	0,004	0,000	0,004
2	S	FQ	0,000		0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,997	0,010	1,000	1,000	1,000	1,000	0,008	1,000
3	S	FB	1,000	0,000		1,000	1,000	0,142	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	1,000	0,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,140	0,091	0,003	0,001	0,000	0,001
5	SA	FQ	1,000	0,000	1,000	1,000		0,569	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
6	SA	FB	1,000	0,005	0,142	1,000	0,569		0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,120	0,066	0,000	0,070
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	SAP	FQ	0,000	0,997	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,001	0,001	0,045	0,083	1,000	0,077
9	SAP	FB	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	0,001
10	SAE	NF	0,382	1,000	0,000	0,140	0,002	1,000	0,000	0,001	0,000		1,000	1,000	1,000	0,000	1,000
11	SAE	FQ	0,252	1,000	0,000	0,091	0,001	1,000	0,000	0,001	0,000	1,000		1,000	1,000	0,000	1,000
12	SAE	FB	0,008	1,000	0,000	0,003	0,000	0,120	0,000	0,045	0,000	1,000	1,000		1,000	0,000	1,000
13	SAPE	NF	0,004	1,000	0,000	0,001	0,000	0,066	0,000	0,083	0,001	1,000	1,000	1,000		0,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000
15	SAPE	FB	0,004	1,000	0,000	0,001	0,000	0,070	0,000	0,077	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	

Tabla 42. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Carbono orgánico total-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable **Carbono orgánico total**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = .13981, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			7.8667	7.2216	7.8633	11.015	12.255	10.673	9.6924	9.9348	9.3400	10.588	11.494	10.626	11.301	12.760	12.948
1	S	NF		1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	0,000	0,000	0,000		0,034	1,000	0,016	0,140	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	0,034		0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	0,001	0,412	1,000	1,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001		0,330	1,000	0,015	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,330		1,000	1,000	0,670	0,000	0,489	0,001	0,000	0,000
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,000	0,140	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,002	1,000	0,011	0,000	0,000
9	SAP	FB	0,004	0,000	0,004	0,001	0,000	0,015	1,000	1,000		0,032	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000
10	SAE	NF	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001	1,000	0,670	1,000	0,032		0,612	1,000	1,000	0,000	0,000
11	SAE	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,002	0,000	0,612		0,835	1,000	0,027	0,005
12	SAE	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001	1,000	0,489	1,000	0,022	1,000	0,835		1,000	0,000	0,000
13	SAPE	NF	0,000	0,000	0,000	1,000	0,412	1,000	0,001	0,011	0,000	1,000	1,000	1,000		0,005	0,001
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	0,000	0,005		1,000
15	SAPE	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,001	1,000	

Tabla 43. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Carbono extraíble total-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable **Carbono extraíble total**
 Probabilities for Post Hoc Tests
 Error: Between MS = .02043, df = 30.000

Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
			2.3883	2.5773	2.8564	3.1000	3.6792	3.3092	3.8905	3.3180	3.6916	3.7754	3.7865	4.1983	4.2968	4.6958	4.6395
1	S	NF		1,000	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	S	FQ	1,000		1,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	S	FB	0,039	1,000		1,000	0,000	0,056	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	0,000	0,011	1,000		0,003	1,000	0,000	1,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	0,003		0,367	1,000	0,444	1,000	1,000	1,000	0,012	0,001	0,000	0,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,056	1,000	0,367		0,003	1,000	0,279	0,041	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,003		0,003	1,000	1,000	1,000	1,000	0,163	0,000	0,000
8	SAP	FQ	0,000	0,000	0,045	1,000	0,444	1,000	0,003		0,339	0,050	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000
9	SAP	FB	0,000	0,000	0,000	0,002	1,000	0,279	1,000	0,339		1,000	1,000	0,016	0,001	0,000	0,000
10	SAE	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,041	1,000	0,050	1,000		1,000	0,112	0,011	0,000	0,000
11	SAE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,031	1,000	0,039	1,000	1,000		0,144	0,014	0,000	0,000
12	SAE	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	1,000	0,000	0,016	0,112	0,144		1,000	0,019	0,073
13	SAPE	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,163	0,000	0,001	0,011	0,014	1,000		0,192	0,664
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,192		1,000
15	SAPE	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,664	1,000	

Tabla 44. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Ácidos húmicos-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Ácidos húmicos																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .01217, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
1	S	NF		1,000	1,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,002	0,000	0,001	0,000	1,000	0,001	0,000	0,000
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	0,000	0,417	0,000	0,041	0,001	0,022	0,002	1,000	0,033	0,000	0,006
3	S	FB	1,000	1,000		0,001	0,000	0,806	0,000	0,083	0,001	0,045	0,005	1,000	0,068	0,000	0,013
4	SA	NF	0,000	0,000	0,001		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,010	1,000	1,000	1,000
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000		0,860	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,005	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	0,020	0,417	0,806	1,000	0,860		0,215	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,706	1,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,215		1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000
8	SAP	FQ	0,002	0,041	0,083	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,001	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,023	1,000	1,000	1,000
10	SAE	NF	0,001	0,022	0,045	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,588	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,000	0,002	0,005	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		0,078	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	1,000	1,000	1,000	0,010	0,005	1,000	0,001	1,000	0,023	0,588	0,078		0,860	0,004	0,193
13	SAPE	NF	0,001	0,033	0,068	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,860		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,706	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,004	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,000	0,006	0,013	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,193	1,000	1,000	

Tabla 45. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad deshidrogenasa-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Deshidrogenasa																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = .06828, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
1	S	NF		1,000	1,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,026	0,000	0,032	0,163	0,001	0,023	1,000	0,244
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	0,000	0,016	0,001	0,056	0,000	0,070	0,341	0,002	0,051	1,000	0,502
3	S	FB	1,000	1,000		0,000	0,000	0,032	0,002	0,113	0,000	0,140	0,655	0,004	0,102	1,000	0,953
4	SA	NF	0,000	0,000	0,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,414	1,000	1,000	0,055	0,280
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,632	1,000	1,000	0,086	0,430
6	SA	FB	0,007	0,016	0,032	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
7	SAP	NF	0,000	0,001	0,002	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,819	1,000
8	SAP	FQ	0,026	0,056	0,113	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,223	1,000	1,000	0,028	0,149
10	SAE	NF	0,032	0,070	0,140	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,163	0,341	0,655	0,414	0,632	1,000	1,000	1,000	0,223	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,001	0,002	0,004	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAPE	NF	0,023	0,051	0,102	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAPE	FQ	1,000	1,000	1,000	0,055	0,086	1,000	0,819	1,000	0,028	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAPE	FB	0,244	0,502	0,953	0,280	0,430	1,000	1,000	1,000	0,149	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 46. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad β -glucosidasa-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable β -glucosidasa																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 1191.8, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,022	1,000	0,000	0,111	1,000	0,506	1,000	1,000
2	S	FQ	1,000		1,000	1,000	1,000	0,000	0,155	1,000	0,001	0,708	1,000	0,077	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	1,000	1,000		1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,044	1,000	1,000	0,002	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	1,000	1,000	1,000		1,000	0,000	0,656	1,000	0,004	1,000	1,000	0,017	1,000	1,000	1,000
5	SA	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000		0,000	0,022	1,000	0,000	0,112	1,000	0,501	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,009	0,000	1,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	SAP	NF	0,022	0,155	1,000	0,656	0,022	0,009		0,005	1,000	1,000	1,000	0,000	0,643	0,102	0,020
8	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,005		0,000	0,026	0,747	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,000	0,001	0,044	0,004	0,000	1,000	1,000	0,000		1,000	0,081	0,000	0,004	0,001	0,000
10	SAE	NF	0,111	0,708	1,000	1,000	0,112	0,002	1,000	0,026	1,000		1,000	0,000	1,000	0,478	0,102
11	SAE	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,747	0,081	1,000		0,001	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,506	0,077	0,002	0,017	0,501	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,001		0,017	0,118	0,548
13	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,643	1,000	0,004	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
14	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,102	1,000	0,001	0,478	1,000	0,118	1,000		1,000
15	SAP	FB	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,020	1,000	0,000	0,102	1,000	0,548	1,000	1,000	

Tabla 47. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad fosfatasa-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Fosfatasa																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 4910.8, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		1,000	0,441	0,000	0,193	0,000	0,036	0,339	0,049	1,000	0,339	0,364	1,000	1,000	0,441
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
3	S	FB	0,441	1,000		0,004	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
4	SA	NF	0,000	0,000	0,004		0,009	1,000	0,052	0,005	0,038	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,004
5	SA	FQ	0,193	1,000	1,000	0,009		0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	0,001		0,003	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	SAP	NF	0,036	1,000	1,000	0,052	1,000	0,003		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,465
8	SAP	FQ	0,339	1,000	1,000	0,005	1,000	0,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
9	SAP	FB	0,049	1,000	1,000	0,038	1,000	0,002	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,621
10	SAE	NF	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
11	SAE	FQ	0,339	1,000	1,000	0,005	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
12	SAE	FB	0,364	1,000	1,000	0,005	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
13	SAP	NF	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
14	SAP	FQ	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,465	1,000	0,621	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
15	SAP	FB	0,441	1,000	1,000	0,004	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabla 48. Valores de probabilidad obtenidos mediante test de Bonferroni para **Actividad ureasa-SUELO ALFALFA**. Valores en rojo muestran diferencia significativa

Bonferroni test; variable Ureasa																	
Probabilities for Post Hoc Tests																	
Error: Between MS = 3.4913, df = 30.000																	
Cell No.	Tratam.	Fertiliz.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}
1	S	NF		1,000	1,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	S	FQ	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	S	FB	1,000	1,000		0,014	0,000	0,000	0,001	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	SA	NF	0,003	0,000	0,014		0,047	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	0,322
5	SA	FQ	0,000	0,000	0,000	0,047		1,000	0,457	0,015	0,000	0,145	0,000	0,120	1,000	1,000	1,000
6	SA	FB	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,417	1,000	1,000
7	SAP	NF	0,000	0,000	0,001	1,000	0,457	1,000		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	1,000	1,000
8	SAP	FQ	0,009	0,000	0,044	1,000	0,015	1,000	1,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,667	0,105
9	SAP	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,650	1,000	0,777	0,002	0,000	0,000
10	SAE	NF	0,000	0,000	0,000	0,000	0,145	0,001	0,000	0,000	0,650		1,000	1,000	1,000	0,003	0,020
11	SAE	FQ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000		1,000	0,006	0,000	0,000
12	SAE	FB	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120	0,001	0,000	0,000	0,777	1,000	1,000		1,000	0,002	0,017
13	SAPE	NF	0,000	0,000	0,000	0,001	1,000	0,417	0,009	0,000	0,002	1,000	0,006	1,000		0,789	1,000
14	SAPE	FQ	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,667	0,000	0,003	0,000	0,002	0,789		1,000
15	SAPE	FB	0,000	0,000	0,000	0,322	1,000	1,000	1,000	0,105	0,000	0,020	0,000	0,017	1,000	1,000	