

AVALUACIÓ DEL CREIXEMENT DEL FONG LIGNINOLÍTIC *TRAMETES VERSICOLOR* SOBRE DIFERENTS SUPORTS SÒLIDS PER A L'APLICACIÓ EN TRACTMENTS DE BIOREMEDIACIÓ

Guillem Llorens Blanch

Directora: Montserrat Sarrà Adroguer

Tutors: Eduard Borràs Camps

Carlos Esteban Rodríguez-Rodríguez

Projecte final de carrera
Ciències Ambientals

No tots els sòls poden produir qualsevol cosa

Virgilio, *Geòrgiques*

Resum

Els fongs de podridura blanca (WRF – de l'anglès: *White-rot fungi*) són de gran interès en l'àmbit de la bioremediació per la seva capacitat de degradar la lignina. La lacasa, un dels enzims extracel·lulars que aquests fongs excreten per degradar la lignina, pot ser utilitzada per degradar els contaminants presents en una matriu donada. *Trametes versicolor* ha estat estudiat per la seva capacitat de produir aquest enzim en residus agrícoles com a substrats. Un primer triatge basat en la producció de CO₂, la mesura de l'activitat lacasa i la quantificació de l'ergosterol han permès seleccionar els substrats on es donava un major poder oxidatiu dels cultius inoculats amb *T.versicolor*. Els posteriors experiments de colonització de sòls, on es monitoritzava l'activitat lacasa i l'ergosterol, han mostrat que *T.versicolor* és capaç de colonitzar sòls i que té una major activitat lacasa en condicions no estèrils. També s'ha provat, mitjançant el test ND24, que *T.versicolor* es capaç de degradar un contaminant emergent, el naproxè, en sòls estèrils i no estèrils esmenats amb residus agrícoles.

Paraules clau: *Trametes versicolor*, sòls, ND24, ergosterol, lacasa

Resumen

Los hongos de podredumbre blanca (WRF – del inglés: *White-rot fungi*) son de gran interés en el campo de la bioremediación por su capacidad de degradar la lignina. La lacasa, una de las enzimas extracelulares que estos hongos excretan para degradar la lignina, puede ser utilizada para degradar los contaminantes presentes en una matriz dada. *Trametes versicolor* ha sido estudiado por su capacidad de producir esta enzima en residuos agrícolas como substratos. Una primera criba basada en la producción de CO₂, la medida de la actividad lacasa i la cuantificación del ergosterol han permitido seleccionar los substratos donde se daba un mayor poder oxidativo de los cultivos inoculados con *T.versicolor*. Los posteriores experimentos de colonización de suelos, donde se monitorizaba la actividad lacasa y el ergosterol, han mostrado que *T.versicolor* es capaz de colonizar suelos i que tiene una mayor actividad lacasa en condiciones no estériles. También se ha probado, mediante el ensayo ND24, que *T.versicolor* es capaz de degradar un contaminante emergente, el naproxeno, en suelos estériles i no estériles enmendados con residuos agrícolas.

Palabras clave: *Trametes versicolor*, suelos, ND24, ergosterol, lacasa

Abstract

White rot fungi (WRF) are of great interest in the field of bioremediation for their ability to degrade lignin. Laccase, an extracellular enzyme excreted by these fungi to degrade lignin, can be used to degrade the pollutants presents in a given matrix. *Trametes versicolor* has been studied for its ability to produce this enzyme in agriculture residues as substrates. An initial sorting based on the CO₂ production, the measurement of laccase activity and the quantification of ergosterol have allowed to select the substrates which gave the crops inoculated whit *T.versicolor* a higher oxidative power. Subsequent experiments of colonization of soils, where laccase activity and ergosterol were monitored, shown that *T.versicolor* is able to colonize soils, whit a higher laccase activity in non-sterile conditions. Also, with the ND24 test, has been shown that *T.versicolor* is capable to degrade an emerging pollutant (naproxen) in sterile and non-sterile soils amended with agricultural residues.

Keywords: *Trametes versicolor*, soils, ND24, ergosterol, laccasa

Agraïments

En primer lloc agrair a les doctores Montserrat Sarrà Adroguer, Teresa Vicent Huguet i Glòria Caminal Saperas el seu temps i dedicació i per haver fet possible aquest projecte.

Així mateix, agrair a en Eduard Borràs Camps i en Carlos Esteban Rodríguez-Rodríguez el seu tracte, dedicació, comprensió, paciència i esforç, ja que sense ells aquest projecte no seria el que és.

Per últim, agrair a totes les persones del grup de recerca i dels diferents laboratoris del departament d'Enginyeria Química de la UAB per tota la col·laboració rebuda.

ÍNDIX

Resum	i
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Bioremediació	2
1.1.1. Micoremediació	4
<i>1.1.1.1. Els fongs ligninolítics</i>	<i>5</i>
<i>1.1.1.2. Trametes versicolor</i>	<i>6</i>
<i>1.1.1.3. Monitorització de processos de micoremediació</i>	<i>7</i>
1.1.2. Valorització de residus lignocel·lulósics	8
2. OBJECTIUS	11
2.1. Objectiu general	12
2.2. Objectius parcials	12
3. MATERIALS I MÈTODES	13
3.1. Soca del fong	14
3.2. Productes químics	14
3.3. Sòl i substrats	14
3.4. Procediments experimentals	14
3.4.1. Condicions de cultiu en els substrats	14
3.4.2. Colonització del sòl	15
3.5. Mètodes analítics	15
3.5.1. Determinació de la humitat	15
3.5.2. Composició elemental dels substrats	15
3.5.3. Determinació de la capacitat de camp	15
3.5.4. Determinació del pH_{aquos} i del pH_{KCl}	16
3.5.5. Quantificació de l'ergosterol	16
3.5.6. Degradació del Naproxè (ND24)	16

3.5.7.	Quantificació del Naproxè	17
3.5.8.	Mesures de CO ₂	17
3.5.9.	Determinació del CO ₂	17
3.5.10.	Activitat lacasa	18
4.	RESULTATS I DISCUSIÓ	19
4.1.	Caracterització dels substrats	20
4.2.	Mesures de CO ₂	21
4.3.	Colonització dels substrats	24
4.3.1.	Seguiment ergosterol	24
4.3.2.	Producció lacasa	25
4.4.	Colonització del sòl estèril	27
4.4.1.	Seguiment ergosterol	27
4.4.2.	Producció lacasa	29
4.5.	Colonització del sòl no estèril	30
4.5.1.	Seguiment ergosterol	31
4.5.2.	Producció lacasa	32
4.6.	Capacitat de degradació del fong en medi sòlid	33
5.	CONCLUSIONS	35
6.	BIBLIOGRAFIA	37

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Bioremediació

El progrés tecnològic que la humanitat ha viscut des de l'aparició de les primeres indústries ha comportat incontables millores en el nostre estil de vida, però també ha provocat que les societats s'hagin d'afrontar a riscos i problemàtiques que fins llavors no existien. La contaminació química del medi ambient és un dels exemples que més atenció ha rebut en els últims anys. Aquesta contaminació, que pot afectar qualsevol compartiment ambiental, ha estat provocada, principalment, per processos que han mobilitzat substàncies ja existents (petroli i metalls pesants, entre d'altres) cap a medis que no els són propis i que no els poden immobilitzar i per processos que han introduït, tant de forma accidental com voluntaria, productes químics de nova síntesi, tals com combustibles, plaguicides, fàrmacs i detergents, entre d'altres.

El destí ambiental dels diferents contaminants que ens puguem imaginar està lligat als processos físics, químics i biològics del compartiment ambiental on aquest es situï. Mentre que el primer procés provoca, majoritàriament, el canvi d'estat físic del contaminant o el moviment d'aquest cap a altres compartiments, els processos químics i biològics són capaços de transformar el contaminant en altres substàncies. També cal destacar que aquests processos de degradació de contaminants es poden donar en els diferents compartiments ambientals: a l'atmosfera, l'aigua i el sòl.

A partir de la dècada dels 80 es va començar a desenvolupar una nova tecnologia basada en la capacitat dels microorganismes per degradar un ampli rang de compostos químics, la bioremediació. Aquesta, que va néixer com una branca de la biotecnologia, preten trobar solució als actuals problemes de contaminació a través dels processos metabòlics dels organismes. És important remarcar que la bioremediació neix d'una necessitat: descontaminar zones, emplaçaments i materials que anteriorment no tenien un valor econòmic però que ara interessa recuperar.

Tot i que existeixen altres processos físics i químics que permeten el tractament de materials i substàncies contaminades amb un menor temps d'operació, aquests poden comportar la generació de subproductes i residus que cal tractar i que, per tant, no eliminen tot el problema. En canvi, la bioremediació permet tractar els mateixos materials i substàncies d'una forma sostenible i amb un cost econòmic menor.

Com succeeix en altres tècniques, la bioremediació es pot trobar limitada per diversos factors, i serà aconsellable detectar-los i tindre'ls en consideració abans d'iniciar el procés (Solanas, 2007):

- El tipus de contaminant a tractar influeix en el grau de bioremediació, donat que no totes les estructures químiques són iguals. Els productes biogènics (com les proteïnes i els lípids) són els que assoleixen un major grau de biodegradabilitat, seguits dels hidrocarburs, i per últim els xenobiòtics (o productes de nova síntesi).
- El metabolisme aeròbic o anaeròbic dels microorganismes determinarà, fortament, les condicions de treball. Pels microorganismes aeròbics caldrà assegurar l'aportació idonea d'oxigen i pels anaeròbics es tindrà d'assegurar la presència de l'acceptor d'electrons específic.
- Els paràmetres específics del sòl, com el pH, el grau d'humitat i la capacitat d'intercanvi catiònic (CIC) entra d'altres, poden determinar el grau de bioremediació assolit, ja que cada microorganisme té els seus rangs òptims i aquests poden no coincidir amb els del material a tractar.
- Els requeriments nutricionals dels microorganismes, per exemple una font de nitrogen i de fòsfor i una font de carboni fàcilment assimilable, que permeti el cometabolisme amb el contaminant. Caldrà aportar al medi aquests nutrients en una proporció equivalent al rendiment de l'organisme per permetre l'activitat metabòlica en aquest medi.

Relacionat amb la descontaminació de sòls, no existeix una única tècnica de bioremediació. Les diferents tècniques que es poden aplicar depenen de l'estratègia de tractament que es vulgui desenvolupar i del lloc o sòl en qüestió.

- Bioremediació intrínseca: es limita a un seguiment de la descontaminació que es dona de forma natural com a conseqüència de l'activitat metabòlica dels microorganismes que hi han, de forma natural i espontània, en el sòl.
- Bioestimulació: consisteix en afavorir el creixement i l'activitat metabòlica de les poblacions microbianes que, de forma natural, es troben en el sòl a tractar. Per tant, el que es busca és augmentar la taxa de degradació mitjançant el control dels paràmetres fisicoquímics del sòl, tals com l'oxigen dissolt i la disponibilitat de nutrients.

- Bioaugmentació: es basa en l'inoculació al sòl de microorganismes que previament s'ha demostrat la seva capacitat per degradar els contaminants presents en el sòl. Aquesta tècnica s'utilitza quan les poblacions microbianes presents en el sòl no poden degradar els contaminants i per tant no és factible portar a terme una bioestimulació. En aquest cas, cal tindre present que els microorganismes que s'inocularan s'han fet créixer en condicions controlades en un laboratori i, un cop inoculats, es trobaran en un escenari de competència amb els microorganismes autòctons, els quals estan més ben adaptats al medi en qüestió.

Pel que fa a l'emplaçament, la bioremediació pot ser *in situ* o *ex situ*.

- Bioremediació *in situ*: quan es porta a terme en el mateix emplaçament, sense moviment de grans masses de sòl. En aquest cas, els inòculs i tots els agents bioestimulants s'hauran de fer arribar fins a les zones del sòl afectades. Això pot ser un inconvenient, a més a més de no poder-se controlar tots els factors ambientals necessaris, però té un cost econòmic inferior a la bioremediació *ex situ*.
- Bioremediació *ex situ*: quan es porta a terme en un altre emplaçament, en una instal·lació específica o és mouen grans masses de sòl. Hi han tres tipologies diferents:
 - *Landfarming*: es disposa el sòl a tractar sobre un sòl no contaminat i es llaura.
 - *Biopila estàtica*: es construeix una pila de sòl i es subministren els inòculs, bioestimulants, aigua i aire a través d'una xarxa de tubs.
 - *Biopila dinàmica*: es construeix una pila de sòl i es subministren els inòculs, bioestimulants i aigua, i periodicament es renova la pila.

1.1.1. Micoremediació

Els fongs són un grup heterogeni de microorganismes eucariotes repartits per tot el medi ambient, degut a que poden sobreviure en gairebé tots els habitats. Gran part dels fongs estan constituïts per unes estructures anomenades micel·lis, que es divideixen en micel·lis vegetatius (encarregats del transport i absorció de nutrients) i micel·lis reproductors (creixen cap a la superfície del medi i formen les estructures

reproductives) (Singh, 2006). En condicions òptimes, els micel·lis reproductors donen lloc a espores, la germinació de les quals dona lloc a unes noves estructures anomenades hifes.

Les hifes són estructures cilíndriques constituïdes per un conjunt successiu de cèl·lules amb una paret cel·lular formada per quitina. La majoria de les hifes dels fongs són septades, però poden presentar porus que permetin el pas del citoplasma i els organuls i la migració dels nuclis cap a diferents parts del micel·li (Singh, 2006). La hifa formada per l'espore (hifa mare) es començarà a ramificar quan les condicions del medi siguin favorables, donant lloc a noves hifes ramificades. Els agregats d'aquestes noves hifes són el que es coneix per micel·li.

És ben conegut que els fongs i les bacteries poden degradar una ampli ventall de materials i compostos (Singh, 2006), però, a diferència dels bacteris, aquests poden tolerar unes concentracions elevades de contaminants. Aquest fet explica, en part, l'extensa utilització dels fongs en estudis de bioremediació (Evans i Hedger, 2001).

1.1.1.1. Els fongs ligninolítics

Els processos de degradació de materials ligninolítics són, encara, relativament desconeguts. Alguns bacteris són capaços de solubilitzar la lignina però no tots la poden degradar. En canvi, bona part dels fongs basidiomicets es troben, de forma natural, descomposant fusta (fongs de podridura blanca) (Harvey i Thurston, 2001).

Els enzims que possibiliten la descomposició de la fusta també poden actuar en la degradació de contaminants orgànics persistents (Singh, 2006). Els fongs ligninolítics són basidiomicets que poden mineralitzar i despolimeritzar la lignina en condicions aeròbies gràcies al seu sistema enzimàtic extracel·lular. Aquest sistema enzimàtic és el principal mitjà pel qual els fongs poden degradar macromolècules insolubles en molècules més petites i solubles que poden ser fàcilment assimilables (Wallenstein i Weintraub, 2008).

Els fongs de podridura blanca poden produir diversos enzims extracel·lulars que poden modificar la lignina i una de les seves principals característiques és que no són específics per un substrat concret, cosa que permet la seva aplicació en la degradació de contaminants en una matriu donada. Els enzims modificadors de lignina són oxidoreductases, els quals poden ser peroxidases (manganès peroxidasa i lignin peroxidasa) i fenoloxidases (lacasa).

Manganès peroxidasa: (MnP) és un enzim extracel·lular secretat per una part dels fongs de podridura blanca. És una glicoproteïna glicosilada que s'usa del H_2O_2 per oxidar el Mn^{2+} a Mn^{3+} -quelat. Les seves expectatives en bioremediació recauen en el fet de poder actuar com un oxidant no específic (i difús) en substrats fenòlics (Harvey i Thurston, 2001).

Lignin peroxidasa: (LiP) va ser la primera peroxidasa en ser associada a la deslignificació de la fusta pel fong *Phanerochaete chrysosporium* per Kirk i Yang (1979). La LiP catalitza l'oxidació dels compostos no fenòlics segrestant un electró de les cadenes laterals de la lignina per formar radicals lliures. La MnP i la LiP estan involucrades en el procés de degradació de la lignina (Katagiri, Tsutsumi i Nishida, 1995), la MnP allibera fragments de lignina que, posteriorment, seran modificats per la LiP (Webster i Weber, 2007) per donar lloc a molècules solubles.

Lacasa: (Lac) és l'enzim extracel·lular més extès entre els fongs de podridura blanca. La lacasa forma part del grup anomenat *blue multicopper oxidases*, cada molècula conté quatre àtoms de coure distribuïts en diferents llocs d'enllaç, i té l'habilitat de reduir l'oxigen a aigua (Harvey i Thurston, 2001). Les lacases poden oxidar àcids fenòlics i metoxifenòlics, els quals també poden ser descarboxilats. A diferència de les peroxidases, la lacasa (una fenoloxidasa) és inespecífica pel substrat i la seva acció no es veu alterada pel monòxid de carboni.

1.1.1.2. *Trametes versicolor*

El fong *Trametes versicolor* (*Coriolus versicolor*), anomenat col·loquialment per “cua de gall d'indi”, és un basidiomicet sapròfit que és habitual trobar en soques d'arbres morts, provocant l'anomenada podridura blanca. Tant els micel·lis com el basidiocarp són resistents a la dessecació i aquest últim, que pot formar un ventall de fins a 10 cm de diàmetre, presenta una superfície velluda, de diverses tonalitats, capaç de retindre l'aigua de pluja (veure figura 1.1) (Webster i Weber, 2007).

El seu sistema enzimàtic és capaç de produir els enzims lignina peroxidasa, manganès peroxidasa i lacasa. Degut a això *T. versicolor* a estat ampliament estudiat per tractar, entre d'altres, aigües residuals amb tints textils, fàrmacs o disruptors endocrins, materials contaminats per policlor fenols (PCPs) i en la deslignificació i decoloració de la cel·lulosa (Rodríguez Couto i Toca Herrera, 2006).

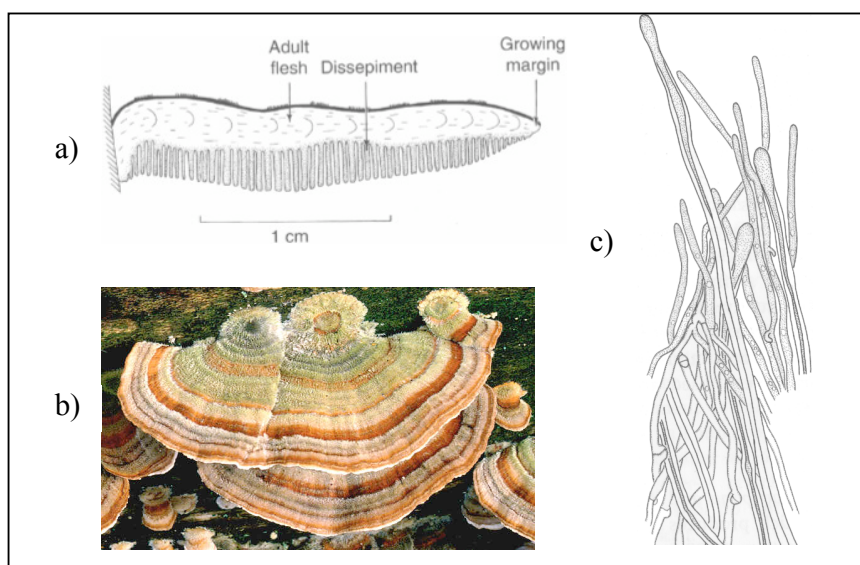


Figura 1.1. *Trametes versicolor*: a) secció vertical a través d'un basidiocarp, b) en estat natural i c) grup d'hifes (Font Webster i Weber, 2007)

1.1.1.3. Monitorització de processos de micoremediació

Com s'ha mencionat anteriorment, el sistema enzimàtic extracel·lular dels fongs de podridura blanca pot degradar xenobiòtics. Degut a això, aquests fongs s'han estudiat ampliament, monitoritzant aquells processos propis del fong per tal d'avaluar el seu comportament, entre d'altres, en una matriu contaminada.

A) L'oxidació de substrats per part de la lacasa sembla ser poc específica. La diferència de potencial redox que s'estableix entre el substrat i els coures situats en el centre actiu de la molècula són el que determinen si el substrat serà oxidat o no (Harvey i Thurston, 2001). La mesura de l'activitat de la lacasa pot oferir una idea de com d'adequat és un substrat per un fong determinat. Per tant, la monitorització d'aquest parametre al llarg del temps permetrà valorar el potencial d'oxidació del sistema fong-substrat.

B) Els fongs i els bacteris són els microorganismes predominants del sòl (Bååth, 2001), però tot i ocupar nínxols ecològics diferents, pot resultar difícil quantificar i diferenciar quanta biomassa pertany a cadascun. L'ergosterol, un dels principals esterols que formen la membrana cel·lular dels fongs filamentosos (Zhao, Lin i Brookes, 2004), s'ha utilitzat com a mesura de la biomassa d'aquests en sòls

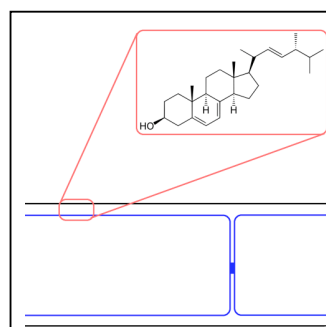


Figura 1.2. Esquema de la situació de l'ergosterol a l'hifa dels fongs

(Seitz *et al.* -1977-, Lee *et al.* -1980- i Matcham *et al.* -1985). En aquests treballs, i posteriors, es tenen en compte dos factors per tal de considerar l'ergosterol com un indicador de la biomassa de fong viu en una matriu: és un esterol que no es troba en animals (Webster i Weber, 2007), plantes vasculars ni altres microbis, a excepció d'algunes microalgues verdes (Davis i Lamar, 1992), i és un compost relativament inestable (Mille-Lindblom *et al.*, 2004) i, per tant, poc temps després de la mort del fong aquest es degrada amb certa rapidesa.

En l'actualitat, l'utilització de l'ergosterol com a indicador de la biomassa dels fongs vius al sòl està sent posada en dubte. El treball de Mille-Lindblom *et al.* (2004) suggereix que l'ergosterol pot persistir en el medi llargs períodes de temps després de la mort del fong, amb un temps de semivida que pot oscil·lar entre els 85 i 151 dies, i que, per tant, no tot l'ergosterol quantificat podria ser atribuït a fong viu. No obstant, l'ergosterol és un bon indicador de biomassa viable del fong i es per aquest motiu que gran part dels treballs realitzats en el camp de la micoremediació es fa servir.

- C) El test de degradació del Naproxè (ND24) és una mesura absoluta de biodegradació, complementaria als altres procediments exposats, basada en la capacitat de *T. versicolor* per degradar, en una matriu sòlida, una petita concentració d'aquest compost (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010). El Naproxè és un antiinflamatori molt extès en l'actualitat, ja que es pot adquirir en qualsevol farmacia sense prescripció mèdica. La seva degradació pot estar catalitzada per la lacasa i el citocrom P450 en *T. versicolor* (Marco-Urrea *et al.*, 2010). Tot i que la degradació dels fàrmacs i dels productes personals de neteja (PPCP – *Pharmaceutical and Personal Care Products*) no són l'objectiu del present treball, i les determinacions d'ergosterol i d'activitat de la lacasa estan àmpliament acceptades per verificar l'activitat del fong, aquest test ofereix l'oportunitat d'aportar informació complementaria sobre l'estat fisiològic del fong i la seva capacitat degradativa.

1.1.2. Valorització de residus lignocel·lulòsics

Les societats humanes produeixen residus sòlids com a resultat de les seves activitats, tant econòmiques com d'estil de vida. A mesura que les poblacions humanes han anat creixent, l'eliminació i tractament d'aquests residus ha estat un gran repte per a les pròpies societats que els generaven. Cal tindre present que els residus sòlids no són

quelcom homogeni i fàcilment classificable, ja que estan formats per una enorme varietat de materials i la seva procedència és igualment variada. Aquest fet provoca que s'hagin desenvolupat diferents alternatives per tal de tractar, valoritzar i reutilitzar els residus en funció de la seva composició.

La valorització dels residus és un conjunt de mètodes, relativament simples i econòmics, que permeten obtenir productes que es poden aplicar en una enorme varietat de camps. Segons la *Ley 10/1998, del 21 de abril, de Residuos*, la valorització de residus es defineix com “*tot procediment que permeti l'aprofitament dels recursos continguts en els residus sense posar en perill la salut humana i sense utilitzar mètodes que puguin causar perjudicis al medi ambient*”.

Segons dades del Instituto Nacional de Estadística (INE) durant l'any 2007 es van generar, a l'Estat Espanyol, 2.284.052 tonelades de materials assimilables a residus agropecuaris. Per residu agrícola s'enten aquell subproducte de rebuig obtingut en cultius llenyosos i vegetals i de restes de poda i neteja de zones forestals.

Els residus agrícoles han estat ampliament utilitzats en estudis anteriors com a substrat en el tractament de matrius sòlides contaminades amb xenobiòtics amb fongs de podridura blanca. A la taula **1.1**, es mostra un recull d'alguns d'aquests estudis dels últims 15 anys. Tal i com es pot observar, s'han utilitzat, preferentment, residus agrícoles no processats.

En el present treball s'han utilitzat residus agrícoles com a substrat lignocel·lulósic pel creixement de fongs ligninolítics per al seu eventual us en bioremediació de sòls contaminats.

En el cas que ens concerneix, es van utilitzar dos tipologies de residus agrícoles diferents: residus tractats i residus no tractats. Els residus agrícoles tractats són els subproductes no comercialitzables per humans que han sofert algun procés industrial per obtenir un producte final estable i comercialitzable. Aquests es caracteritzen per ser un producte heterogeni i per un grau d'humitat baix. Per la seva part, els residus agrícoles no tractats, que també són subproductes no comercialitzables per humans, es caracteritzen per ser un material relativament homogeni però amb un elevat grau d'humitat.

Taula 1.1. Estudis de bioremediació amb fongs de podridura blanca (WRF – *White-rot fungi*) utilitzant residus agrícoles com a substrat

Contaminant	Fong	Substrat	Referència
Policlor fenols (PCP)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> i <i>T.versicolor</i>	Serradures, midó i farina de blat de moro	Leřtan <i>et al.</i> (1996)
Benzo[a]pirè, clorobenzè, crisè, naftalè, fenols i metalls pesats	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> i <i>Marasmiellus troyanus</i>	Serradures i panotxes de blat.	Childress <i>et al.</i> (1998)
Hidrocarburs aromàtics policíclics (PAH)	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> i <i>T.versicolor</i>	Serradures	Novotn'y <i>et al.</i> (1999)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Malta	Rodríguez Couto <i>et al.</i> (2001)
Fenol vermell	<i>T.versicolor</i>	Llavors i tiges de raïm i segó d'ordi	Lorenzo <i>et al.</i> (2002)
	<i>T.versicolor</i>	Malta	Rodríguez Couto <i>et al.</i> (2003)
Policlor fenols (PCP)	<i>T.versicolor</i> and <i>Trametes</i> sp.	Serradures de <i>Pinus radiata</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> i <i>Populus deltoids</i> .	Christopher <i>et al.</i> (2007)
Melassa	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palla de blat i panotxes de blat de moro	Pant i Adholeya (2007)
	<i>Pleurotus ostreatus</i> i <i>P. sajor-caju</i>	Residus de viticultura, serradures i palla d'arròs, de sèsam i de blat	Kurt i Buyukalaca (2010)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Polpa de poma, residus de l'indústria cervesera, residus de pesca i llots de l'indústria del paper	Gassara, Brar, Tyagi, Verma i Surampalli (2010)

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

2.1 Objectiu general

Desenvolupar l'estrategia de colonització d'un sòl per *T.versicolor* mitjançant l'addició de substrats lignocel·lulòsics.

2.2 Objectius parcials

- Caracteritzar els substrats lignocel·lulòsics
- Avaluar la capacitat de colonització dels substrats pel fong *T.versicolor* considerant la producció de diòxid de carboni, lacasa i ergosterol
- Estimar la capacitat de *T.versicolor* per colonitzar sòl estèril i no estèril
- Valorar la capacitat degradativa de *T.versicolor* en sòl

MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Soca del fong

La soca de *T.versicolor* ATCC 42530 va ser adquirida a la American Type Culture Collection i mantinguda per subcultius cada 30 dies en placa d'agar al 2% en pes d'extracte de malta (pH 4.5) a 25°C. La suspensió micelial de *T.versicolor* es va preparar segons el procediment descrit per Borràs (2007).

3.2. Productes químics

El naproxé ((S)-(+)-methoxy- α -methyl-2-naphthalene acetic acid, 98%) i l'ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, >95%) van ser adquirits a Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO).

3.3. Sòl i substrats

El sòl utilitzat procedeix d'un horitzó A d'un sòl agrícola de Prades (Catalunya), tamisat a 5 mm i emmagatzemat a 4°C a la foscor. Les principals característiques físiques d'aquest sòl són: pH_{aquos} 5.1, pH_{KCl} 4.5, 2% de materia orgànica, 77.35% de sorra, 2.10% de llim, 10.55% d'argila, C_{org} 1.28%, 0.12% N_{tot} i 12.1% de capacitat de retenció d'aigua (tots els percentatges referits a pes).

Com a substrats es van utilitzar quatre residus agrícoles i tres pinsos per conill. Com a substrats agrícoles es va fer servir panotxa de blat de moro – **Pn** –, serradures – **Se** –, pellofes d'arròs – **Ar** – i palla – **Pa** –. Les tres tipologies de pinsos per conill utilitzades foren Praga – **C1** – (preparat a base de palla), Pinso Suprem – **C2** – i Pinso Figueres – **C3** – (tots dos pinsos estan destinats a l'engreix dels animals).

3.4. Procediments experimentals

3.4.1. Condicions de cultiu en els substrats

Es van preparar dos grups de tubs de pyrex (100 x 24 mm), el primer grup amb 3 g en pes sec (PS) de cada substrat, per triplicat, per les proves d'activitat lacasa i ergosterol i el segon amb 0.5 gPS de cada substrat, per triplicat, per a les proves ND24. Tots els tubs van ser autoclavats dos cop abans de ser inoculats. Posteriorment, es va procedir, en condicions estèrils, a humitejar els substrats amb aigua destil·lada estèril fins assolir el 60% d'humitat i a l'inoculació de 1 mL de solució micelial de *T.versicolor*. Els cultius van ser incubats a 25°C fins al moment de la seva utilització.

Tot el contingut de cada mostra va ser sacrificat en el moment de realització de les proves.

3.4.2. Colonització del sòl

Es van utilitzar cultius de 7 dies, preparats segons el procediment exposat a l'apartat 3.4.1., als quals se'ls va addicionar sòl estèril per al primer experiment de colonització i sòl no estèril per al segon experiment de colonització. Es van afegir 9 g de sòl per al primer grup de tubs (proves d'activitat lacasa i ergosterol) i pel segon grup de tubs 1.5 g de sòl (prova ND24) i es va realitzar l'assaig per triplicat. Treballant en condicions esterils, es va adicionar el sòl, es va homogeneïtzar la mostra i es va afegir aigua fins assolir un 60% d'humitat. Els cultius van ser incubats a 25°C fins al moment de realitzar les proves corresponents, on es va sacrificar el total de cada mostra.

3.5. Mètodes analítics

3.5.1. Determinació de la humitat

La determinació de l'humitat inicial del sòl es va fer pesant un volum homogeni de sòl en un vas de precipitats i deixant-lo secar a 105°C durant 24 h. Es va calcular com la diferència entre el pes inicial i el pes sec de sòl i es va expressar com percentatge d'humitat.

3.5.2. Composició elemental dels substrats

La determinació de la composició elemental dels diferents substrats es va realitzar al Servei d'Anàlisi Química (SAQ) de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra). La composició elemental es determinava per combustió dels substrats a 1200°C en atmosfera d'oxigen i posterior quantificació per cromatografia de gasos del carboni, nitrogen i hidrogen. Per la seva part, el sofre es va determinar utilitzant un analitzador elemental CHNS Eurovector 3011. Els resultats es van expressar com a percentatge de massa.

3.5.3. Determinació de les capacitats de camp

La determinació de la capacitat de camp dels diferents substrats i del sòl es va realitzar per triplicat omplint cilindres oberts pels dos extrems (un dels extrems recobert amb paper de filtre per evitar possibles pèrdues de material) fins a una tercera part del seu volum amb els substrats. Es van dipositar en una safata amb aigua, la qual cobria l'alçada dels substrats sense superar-la, durant 2 h. Posteriorment, es van deixar secar

per capilaritat sobre paper de filtre durant 30 min, per extreure l'excés d'aigua, i, a continuació, es van secar a 105°C durant 24 h. La quantificació de la capacitat de camp dels substrats es va fer per diferència entre el pes humit i el pes sec final i es va expressar com a grams d'aigua per gram de substrat sec.

3.5.4. Determinació del pH_{aquos} i del pH_{KCl}

Per mesurar el pH_{aquos} i pH_{KCl} es van dissoldre 5 g de cada substrat en 25 mL de solució, aigua destil·lada i KCl respectivament, i es van agitar durant 15 min a 120 rpm. Transcorregut aquest temps, es van deixar reposar durant 1 h i es va realitzar la mesura del pH del sobrenedant. Les mesures de pH_{aquos} i pH_{KCl} de la barreja de sòl més substrat es van realitzar de la mateixa forma però dissolent 10 g de la barreja en 25 mL de cada solució.

3.5.5. Quantificació de l'ergosterol

L'ergosterol va ser extret dels cultius amb substrat o amb subtrat i sòl homogeneïtzats, tal i com s'ha descrit anteriorment (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010). De forma resumida, entre 0.5 i 0.8 g de cada mostra es van extreure amb una solució d'1 mL de ciclohexà i 3 mL de KOH-metanol (10% m/v) durant 90 min a 70°C (es va aplicar sonicació durant el primers 15 min, J.P. Selecta, Barcelona). Posteriorment es va afegir 1 mL d'aigua destil·lada i 2 mL de ciclohexà i la mescla va ser vortejada i centrifugada a 3500 rpm durant 5 min (Heraeus Pico21 Centrifuge, Thermo Electron Corporation, USA). Es va recuperar la fase orgànica i la fase aquosa va ser rentada, dos cops, amb 2 mL de ciclohexà. La fase orgànica es va posar sota un corrent gasos de N_2 per tal d'evaporar-la i el residu es va redissoldre en 1 mL de metanol durant 15 min a 40°C. L'anàlisi es va portar a terme en un HPLC (Dionex 3000 Ultimate, Sunnyvale, CA) equipat amb un detector UV a 282 nm, utilitzant una columna de fase inversa Grace Smart RP18 (250 x 4 mm, mida de partícula 5 μm , Deerfield, IL). L'eluent era metanol amb un cabal d'1 mL·min⁻¹. El temps de retenció per l'ergosterol és d'aproximadament 6.8 min. El contingut d'ergosterol va ser expressat com a mil·ligrams per gram de pes sòlid sec (mg·gPS⁻¹).

3.5.6. Degradació del Naproxè (ND24)

Es va utilitzar una prova basada en la degradació del naproxé en 24 hores (ND24), definida per Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2010), com a indicador de la capacitat degradativa del fong en sòls esmenats amb diferents substrats. Per triplicat, es van

utilitzar cultius de 11 i 20 dies per al sòl estèril i cultius de 10 i 13 dies per al sòl no estèril, amb un contingut total, en pes sec, de 2 g, als quals se'ls va addicionar una solució de naproxé per obtenir una concentració final aproximada de $0.01 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$. A més, es van utilitzar cultius previament autoclavats, com a controls inactivats per calor a cada temps de mostreig, per triplicat. Després de 24 h, el contingut total dels cultius es va liofilitzar (liofilitzador Virtis Sentry, Gardiner, NY) i, posteriorment, sotmesos a una extracció líquida per Soxhlet (Buchi 811, Suïssa) utilitzant metanol com a solvent i amb els següents paràmetres d'operació: *fase 1*: 2 h i 20 cicles a nivell 14 de temperatura, *fase 2*: 10 min, nivell 14 i inert gas (N_2) i *fase 3*: 30 min, nivell 5 i inert gas (N_2). El volum de mostreig es va ajustar a 10 mL i es van preparar alíquotes de 1.5 mL que van ser centrifugades (Heraeus Pico21 Centrifuge, Thermo Electron Corporation, USA) a 10000 rpm durant 5 min; el sobrenedant va ser transferit a vials amber per HPLC per al posterior anàlisi. L'extracció quantitativa del naproxé va ser verificada previament per aquest mètode ($>95\%$).

3.5.7. Quantificació del Naproxé

Els anàlisis de naproxé es van realitzar per HPLC (Dionex 3000 Ultimate, Sunnyvale, CA) equipat amb un detector UV a 230 nm. La separació cromatogràfica es va portar a terme mitjançant l'injecció de 20 μL de les mostres en una columna Grace Smart RP18 (250 x 4 mm, mida de partícula 5 μm , Deerfield, IL) i una fase mòbil al 65% d'àcid acètic 6.9 mmol L^{-1} i el 35% d'acetonitril, bombejats isocràticament a $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Stafiej *et al.*, 2007). El temps de retenció va ser aproximadament de 14.1 min.

3.5.8. Mesures de CO_2

Es van preparar ampolles tipus wheaton de 160 mL, tancades hermèticament amb sèptum teflonat, amb 3 gPS de cada tipus de substrat i per valor d'humitat desitjat, per triplicat. Totes les ampolles van ser autoclavades dos cop abans de ser inoculades. Posteriorment, es va procedir, en condicions estèrils, a humitejar els substrats amb aigua destil·lada estèril fins assolir els valors d'humitat desitjats i a l'inoculació de 1 mL de solució micel·lial de *T.versicolor*. Els cultius van ser incubats, en el transcurs de la prova, a 25°C .

3.5.9. Determinació del CO₂

Els anàlisis de CO₂ es van realitzar utilitzant un cromatograf de gasos HP5890 equipat amb un detector FID. La separació cromatogràfica es va fer mitjançant l'injecció de 100 µL de les mostres en una columna Porapac (3000 mm) a 70°C i amb heli com a gas portador. El temps de retenció va ser aproximadament de 1.8 min.

3.5.10. Activitat Lacasa

L'enzim lacasa es va extreure d'acord amb el mètode modificat de Lang *et al.* (1998): es van adicionar 30 mL de tampó d'acetat de sodi (0.16M, pH 5) a 3 g de mostra homogeneïtzada i es van agitar durant 30 min a 4°C. Es van pendre 1.5 mL dels extractes i es van centrifugats a 15 000 g durant 15 min (Beckman J2-21M/E Centrifuge, Espanya) i, a continuació, s'analitza el sobrenedant. L'activitat enzimàtica es va mesurar mitjançant el primer pas del mètode per a la determinació del manganès peroxidasa (Wariishi *et al.*, 1992) utilitzant 2,6-dimetoxifenol (DMP) com a substrat. L'activitat lacasa s'expressada com unitats d'activitat per gram de pes sòlid sec (UA·gPS⁻¹); una unitat d'activitat es defineix com un micromol de DMP oxidat per minut (µmol·min⁻¹).

RESULTATS I DISCUSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSIÓ

En aquest apartat es presenten i discuteixen els resultats obtinguts en el transcurs de les proves realitzades. Els experiments realitzats es van dividir en tres fases, d'acord amb els objectius parcials descrits a l'apartat 2. La primera fase es planteja com la caracterització de tots els substrats a emprar i la selecció dels substrats més adients per la producció enzimàtica i creixement de *T.versicolor*, en base a la composició elemental dels substrats, la producció de CO₂ del fong al colonitzar-los i la mesura de l'activitat lacasa i de la biomassa (desenvolupat en els subapartats 4.1. i 4.2.). Un cop es van escollir els substrats més adients, es va iniciar la segona fase experimental, que preten avaluar la capacitat del fong per colonitzar sòls esmenats amb els substrats seleccionats en l'anterior fase (subapartats 4.4. i 4.5.). L'última fase (exposada al subapartat 4.6.) es va plantejar per tal d'avaluar la capacitat degradativa d'un compost químic específic per *T.versicolor* en sòl.

4.1. Caracterització dels substrats

A la taula 4.1. es presenten les principals propietats fisicoquímiques dels diferents substrats utilitzats. Cal fixar-se que els substrats *C1*, *C2* i *C3* presenten una capacitat de camp i uns valors de pH_{aq} i pH_{KCl} força similars, però les relacions C/N són sensiblement diferents, especialment entre *C1* i els altres dos. També cal destacar la semblança entre *Pa* i els substrats *C2* i *C3* pel que fa a les capacitats de camp i amb *C1* pel que fa a la capacitat de camp i la relació C/N.

Taula 4.1. Caracterització fisicoquímica dels diferents substrats utilitzats

Substrat	Capacitat de camp (gH ₂ O·g subs ⁻¹)	C (%m)	H (%m)	N (%m)	O (%m)	S (%m)	C/N (m/m)	pH _{aq}	pH _{KCl}
<i>C1</i>	3,13	41,51	5,89	1,03	51,6	< 1%	40,15	5,65	5,66
<i>C2</i>	3,33	40,65	6,10	3,46	49,8	< 1%	11,75	5,35	5,15
<i>C3</i>	3,37	39,93	6,21	2,50	51,4	< 1%	15,98	5,31	5,13
<i>Pn</i>	1,03	45,15	6,48	0,57	47,8	< 1%	79,67	3,99	3,44
<i>Pa</i>	3,66	42,69	5,99	0,83	50,5	< 1%	51,39		
<i>Se</i>	2,3	40,80	5,38	0,33	53,5	< 1%	121,32	3,96	3,47
<i>Ar</i>	7,2	46,60	6,11	0,04	47,2	< 1%	1075,32	5,33	4,79

Segons estudis anteriors del grup de recerca en què s'enmarca el treball, el pH òptim per la producció de lacasa de *T.versicolor* en medi líquid es situa al voltant de 4.5 (Lorenzo *et al.*, 2002). Donat això, i considerant un rang de tolerància de pH de 4–5.5, és d'esperar que els diferents substrats siguin aptes per a la producció de lacasa.

Altrament, les relacions C/N queden dintre del rang òptim descrit per molts autors per a la producció de lacasa, situat entre 15:1 i el 30:1. Tal i com es pot apreciar a la taula 4.1, el substrat **C3** és l'únic que es troba dintre d'aquest rang, però els substrats **C1** i **C2** hi estan bastant pròxims. Tot i que les diferències en el percentatge de carboni entre els substrats són relativament altes (rang del 6.67% entre el valor més baix – **C3** – i el valor més alt – **Ar**) i les diferències en quan a percentatge de nitrogen són menys significatives (rang del 3.42% entre el valor més baix – **Ar** – i el valor més alt – **C2**) és aquest últim component el que pot fer que un substrat sigui més idoni per *T.versicolor*, ja que al ser el component minoritari actuarà com a factor limitant en el creixement del fong i, possiblement, estimularà la producció d'enzims ligninolítics.

Per la seva part, la capacitat de camp màxima es dona pel substrat **Ar**, però és força similar pels substrats **C1**, **C2**, **C3** i **Pa** i és més baixa en els substrats **Se** i **Pn**. La capacitat de camp s'ha d'entendre com una mesura de la porositat aparent de cada substrat i, per tant, de la capacitat de cadascun per retindre aigua per capil·laritat. Cal tindre present que el fong necessita de la presència d'aigua en el medi però també en produeix en la respiració. Per tant, caldra seleccionar aquells substrats que permetin una bona disponibilitat d'aigua al fong però evitant que es doni un excés d'aigua que pugui afavorir altres organismes que entrin en competència amb *T.versicolor* (Baldrin, 2004)

4.2. Mesures de CO₂

La producció de CO₂ per *T.versicolor* es deu al consum del substrat. Com qualsevol altre organisme que realitza la respiració aeròbica, el fong oxida la matèria orgànica consumint oxigen i produïu, entre d'altres, aigua i diòxid de carboni.

Tal i com es pot apreciar a la figura 4.1, la producció de CO₂ per cada substrat és diferent, però es poden agrupar en dos grups en funció de la tendència observada i dels rangs de concentració de CO₂.

Per una part, hi ha el grup format pels substrats **C2** i **C3** (figura 4.1. a i b, respectivament). Aquests presenten un màxim de la concentració de CO₂ unes 40 unitats superior a la dels altres substrats. Tot i que la fase de latència és similar als altres substrats, es dona durant les 24 h posteriors a l'inoculació de *T.versicolor*, la fase de creixement és més prolongada i la producció de CO₂ no s'estabilitza, aproximadament, fins el dia 6-8, amb un valor de 46.9% CO₂ per **C2** i **C3** (60% d'humitat en tots dos casos). Posteriorment, s'observa un augment de la concentració el dia 13, assolint-se

valors màxims de CO₂ del 82.2% (80% d'humitat) per **C2** i del 84.6% (60% d'humitat) per **C3**.

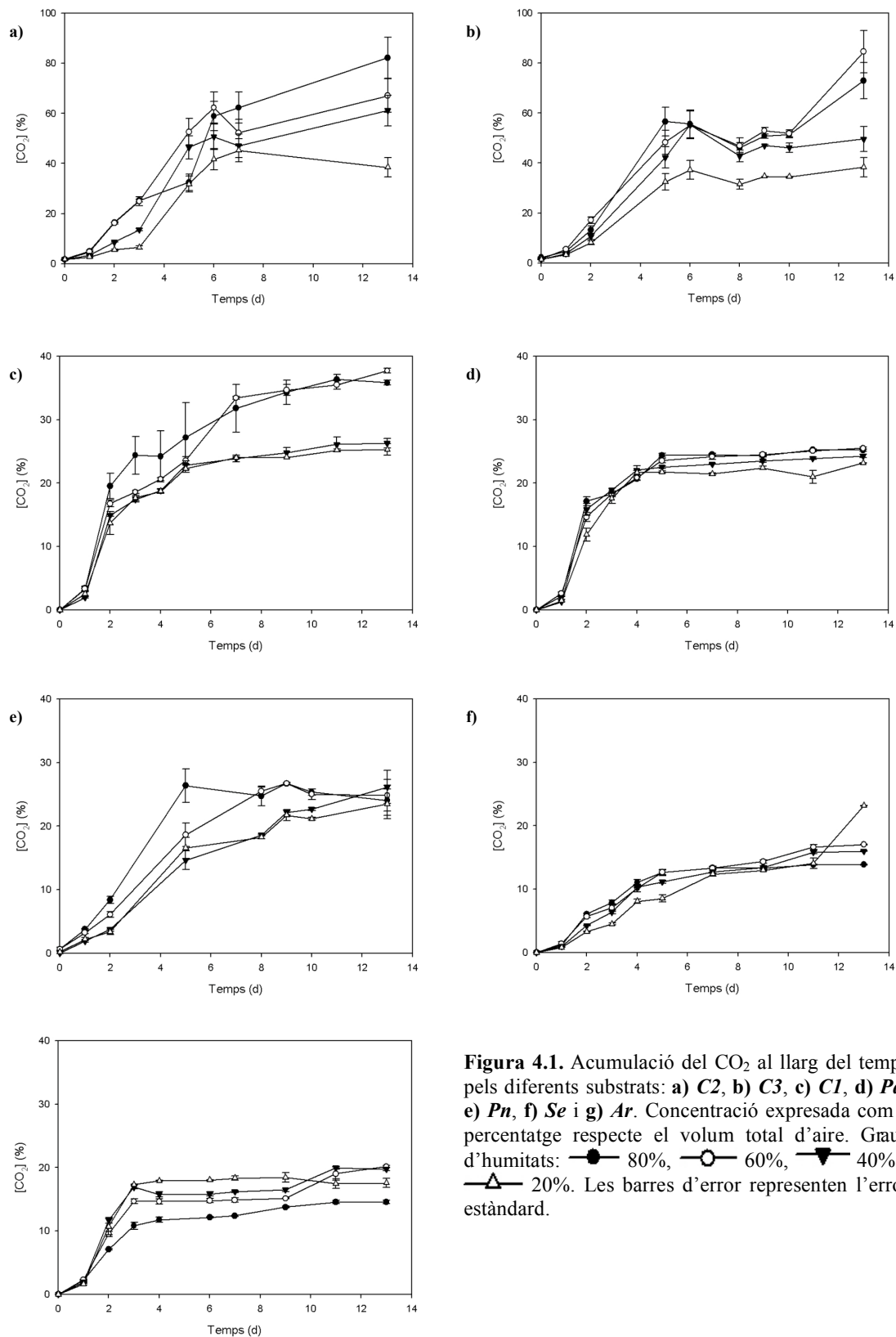


Figura 4.1. Acumulació del CO₂ al llarg del temps pels diferents substrats: **a) C2**, **b) C3**, **c) C1**, **d) Pa**, **e) Pn**, **f) Se** i **g) Ar**. Concentració expressada com a percentatge respecte el volum total d'aire. Graus d'humitats: ● 80%, ○ 60%, ▼ 40% i ▲ 20%. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Per altra part, cal considerar un altre grup format pels substrats ***C1***, ***Pa***, ***Pn***, ***Se*** i ***Ar*** (figura 4.1. **c**, **d**, **e**, **f** i **g**, respectivament) on també s'observa una fase de latència durant les primeres 24 hores, però entre els dies 1 i 5 es dona una fase de creixement exponencial, assolint una concentració màxima de CO₂ del 37.7% pel substrat ***C1*** amb una humitat del 60%.

També cal tindre present les diferències que es donen per cada grau d'humitat i substrat. Mentre que per ***Pa***, ***Pn***, ***Se*** i ***Ar*** no hi ha una diferència acusada en la producció de CO₂ pels diferents nivells d'humitat, per ***C1***, ***C2*** i ***C3*** cada grau d'humitat presenta unes diferències no menyspreables quant a tendència i a concentració de CO₂. En general, a major contingut d'humitat es detecta una major concentració de CO₂ i, per tant, es pot suposar un major creixement del fong.

Aquest fet es pot explicar per un diferent comportament dels substrats vers la humitat. Els substrats ***C1***, ***C2*** i ***C3*** presenten una porositat aparent major (augment del volum a l'incrementar-se la humitat, donant lloc a materials més voluminosos i esponjosos) a la dels substrats ***Pa***, ***Pn***, ***Se*** i ***Ar***. Altrament, els substrats ***C1***, ***C2*** i ***C3*** a baixos nivells d'humitat presenten uns valors màxims en les concentracions de CO₂ relativament properes a les dels altres substrats.

Donat els valors presentats, aquesta prova es va poder utilitzar per realitzar un primer triatge dels substrats en funció del CO₂ produït, assumint que aquest està relacionat amb la capacitat de *T.versicolor* per assimilar cada substrat. Es va decidir no utilitzar en els següents experiments els substrats ***Se*** i ***Ar*** perquè donaven una menor concentració de CO₂, per sota del 20% en gran part dels punts de mostreig, durant la fase de manteniment del fong. Altrament, es va decidir treballar amb una humitat al 60% perquè amb aquesta s'obtenien unes elevades concentracions de CO₂ i perquè un menor contingut en aigua disminueix les possibilitats que el cultiu sigui contaminat per altres microorganismes, tals com bacteries; és a dir, a menor quantitat d'aigua major efecte selectiu pel creixement del fong vers altres organismes.

4.3. Colonització dels substrats

A la segona part de la primera fase experimental es va estudiar el comportament del fong sobre els substrats seleccionats anteriorment en condicions estèrils. Per una part, es va monitoritzar el creixement del fong mitjançant el seguiment de la biomassa viable de

fong en els substrats a través de la quantificació de l'ergosterol. Per altra part, es va fer un seguiment del seu sistema enzimàtic extracel·lular a partir del seguiment de l'activitat lacasa.

4.3.1. Seguiment ergosterol

A la figura 4.2. es representen els valors d'ergosterol obtinguts en *T.versicolor* inoculat sobre substrat estèril. Tal i com es pot observar, hi ha una gran variabilitat al llarg del temps i entre els diferents substrats, però es poden apreciar unes certes tendències entre grups de substrats.

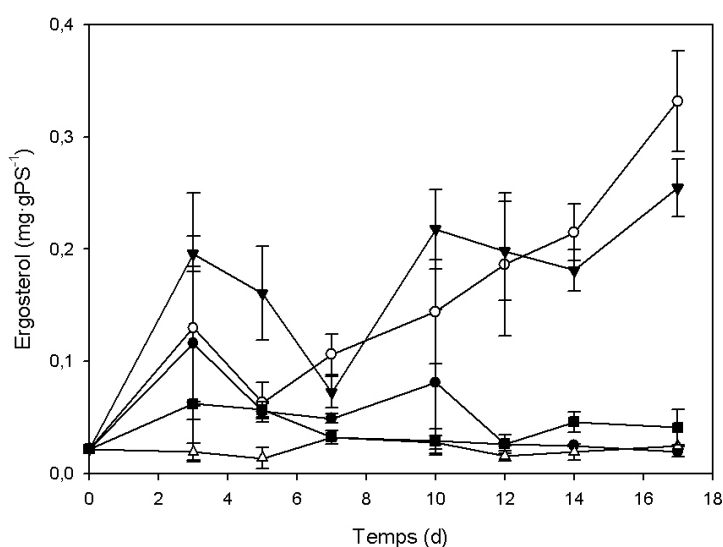


Figura 4.2. Seguiment de la concentració d'ergosterol en cultius de *T.versicolor* en 3 g dels substrats: *C1* —●—, *C2* —○—, *C3* —▼—, *Pn* —▲— i *Pa* —■—. El dia 0 el valor d'ergosterol és teòric, considerant que 1 mL de solució micel·lial té una concentració de biomassa de 0.05 g. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Els substrats *C2* i *C3* segueixen una mateixa tendència. En la primera mostra, després de tres dies des de l'inoculació, s'observa un nivell elevat d'ergosterol de $0.130 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ i $0.196 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, respectivament, però que disminueix en la següent mostra per tornar a augmentar continuant amb una tendència linial a partir del dia 7 des de l'inoculació sense que s'observi una estabilització al final de l'experiment. Els nivells assolits el dia 17 són de $0.332 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ i $0.254 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, respectivament.

Per altra part, el substrat **C1** es detecta un nivell d'ergosterol a la primera mostra de $0.116 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, molt similar a l'obtingut amb el substrat **C2**, però a diferència del substrat **C1** el nivell d'ergosterol disminueix lentament fins el final de l'experiment.

Finalment, pels substrats **Pn** i **Pa** es detecten nivells d'ergosterol molt baixos ($0.062 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ i $0.019 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, respectivament, el dia 3) amb molt poca variació al llarg del temps.

Visualment es va comprovar que els substrats **C2** i **C3** eren els que experimentaven un major creixement del fong, seguits del substrat **C1**. Per tots tres el creixement va ser força homogeni entre els diferents cultius al llarg de l'experiment. El substrat **Pa** presentava un creixement força més baix que els anteriors però es va poder observar el creixement del fong des del primer dia. En canvi, el substrat **Pn** va presentar, visualment, un creixement molt baix i no va ser fins al dia 5 que es van començar a apreciar els primers indicis de creixement en alguns dels cultius.

Amb les mesures de l'acumulació del CO_2 s'havia observat que els substrats **C2** i **C3** eren els que presentaven una major concentració de CO_2 , seguits per **C1**, i que **Pa** i **Pn** eren els substrats amb una menor concentració i amb uns valors similars. Amb el seguiment de l'ergosterol s'ha observat la mateixa tendència, **C2** i **C3** són els substrats que presenten una major biomassa viable de fong, seguits per **C1** amb una concentració d'ergosterol força inferior respecte els anteriors. Finalment, **Pa** i **Pn** són amb els que s'ha obtingut una menor concentració d'ergosterol, que a anat decreixent al llarg del temps.

4.3.2. Producció lacasa

En aquest primer experiment de colonització en condicions estèrils, l'activitat de la lacasa va ser utilitzada, juntament amb l'ergosterol presentat anteriorment, com un segon mètode per seleccionar els substrats més adients pel creixement de *T.versicolor*.

Com es pot observar a la figura **4.3.b** el substrat **C2** és el que presenta una major activitat lacasa, aproximadament un ordre de magnitud superior als altres substrats, assolint un màxim de $12.21 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 10. Per aquest substrat es dona un augment de l'activitat lacasa sostingut i practicament linial fins el valor màxim. A partir d'aquest comença a descendir fins el dia 14 ($2.066 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$), on experimenta un nou ascens ($6.080 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$). Donat això, es pot considerar que *T.versicolor* no comença a excretar

la lacasa fins el dia 3. Posteriorment, a partir del dia 10, s'observa un decreixement en l'activitat que es podria atribuir a la desactivació del sistema enzimàtic.

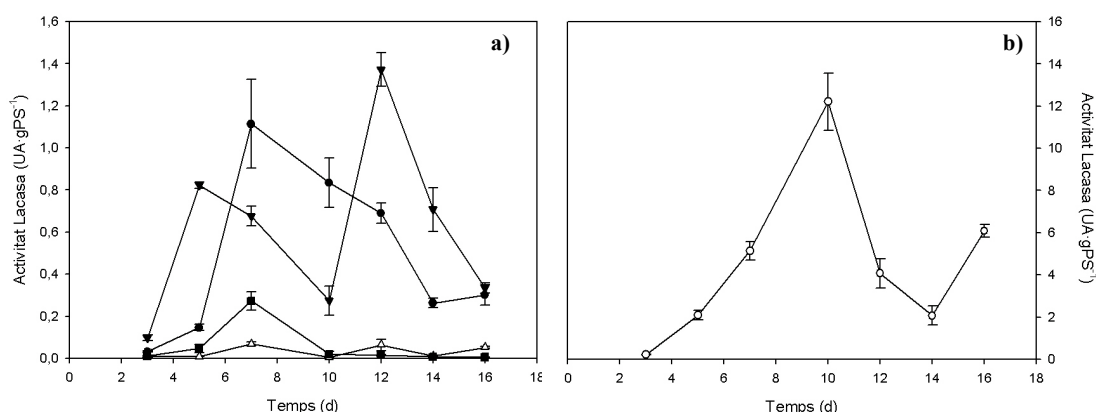


Figura 4.3. Seguiment de l'activitat lacasa en cultius de *T. versicolor*. a) : **C1** —●—, **C3** —▼—, **Pn** —△— i **Pa** —■— i b) **C2** —○—. L'activitat lacasa està expressada com a unitat d'activitat (UA) per gram de matriu sòlida en pes sec. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Els substrats **C1** i **C3** (figura 4.3.a) són els següents en presentar una major activitat lacasa, dintre del mateix rang i amb unes tendències diferents, assolint uns màxims de $1.113 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ i $1.371 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ els dies 7 i 12, respectivament. Pel substrat **C1** l'excreció de la lacasa s'observa a partir del dia 5 i continua fins el dia 7, moment en el qual assoleix el valor màxim. A partir d'aquí, comença a disminuir fins el dia 14, on es manté gairebé constant fins el dia 16. El substrat **C3** presenta un comportament més oscil·lant, amb un creixement important entre els dies 2 i 3 seguit d'un interval de descens fins el dia 10. Posteriorment assoleix el seu màxim, però disminueix bruscament entre els dies 14 i 16, assolint un valor ($0.334 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$) proper al del substrat **C1** en el mateix temps ($0.301 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$).

Els substrats **Pa** i **Pn** són els que assoleixen uns valors més baixos, amb uns màxims de $0.273 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ i $0.068 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$, respectivament, el dia 7. En tots dos substrats no es detecta lacasa fins el dia 7, així com els nivells detectats a partir del dia 10 són menyspreables.

En base als resultats obtinguts en la quantificació d'ergosterol i l'activitat lacasa sobre substrats es va decidir no utilitzar les substrats **Pa** i **Pn** en els posteriors experiments. Per una part, són els substrats que presenten una menor biomassa viable de fong en el transcurs de les proves realitzades i és necessari que al treballar amb sòl, en el moment de l'addició d'aquest, el fong estigui en unes òptimes condicions per tal que

pugui afrontar les noves condicions de l'ambient i colonitzar-lo amb èxit mantenint la capacitat degradativa. Per altra part, també han estat eliminats perquè són els substrats on la lacasa ha estat força més baixa, ja que és del nostre interès màximitzar la producció de lacasa per a futurs treballs de tractament de sòls contaminats, ja que s'ha demostrat que aquesta, entre d'altres sistemes enzimàtics que hi poden intervenir, està implicada en la degradació de diversos pollutants.

4.4. Colonització del sòl estèril

A la segona fase experimental es va estudiar el comportament de *T.versicolor* sobre sòl estèril esmenat amb els substrats previamente seleccionats. En aquest experiment es van fer servir cultius de *T.versicolor* precrescuts en substrats estèrils als quals se'ls va addicionar sòl estèril en el moment d'iniciar els experiments. Com en l'apartat 4.3. s'ha monitoritzat l'ergosterol i la lacasa per avaluar l'estat de *T.versicolor*. Altrament, a la taula 4.2. es presenten els pHs de les matrius utilitzades en aquesta fase experimental. En general es pot observar que l'addició de sòl als substrats fa disminuir el pH d'aquests lleugerament (excepte el pH_{aq} del sòl esmenat amb *C1*), però els valors de pH continuent quedant dintre del rang òptim definit anteriorment.

Taula 4.2. Valors dels pHs del sòl esmenat amb substrats

Mescla	pH _{aq}	pH _{KCl}
Sòl + <i>C1</i>	5,81	5,47
Sòl + <i>C2</i>	5,26	5,01
Sòl + <i>C3</i>	5,21	4,91

4.4.1. Seguiment ergosterol

En aquest cas (figura 4.4.), els valors inicials d'ergosterol (dia 0) disminueixen bruscament fins al dia 4 com a conseqüència d'addició del sòl estèril (dia 0) en els cultius de 7 dies d'antigüitat. S'observa una fase de latència, deguda al procés d'addició i homogenització de la matriu substrat-sòl, que pels substrats *C2* i *C3* dura fins al dia 4 i per *C1* s'allarga fins el dia 6. Com en la colonització sobre substrats, les tendències de l'ergosterol són oscil·lants però segueixen una tendència comuna.

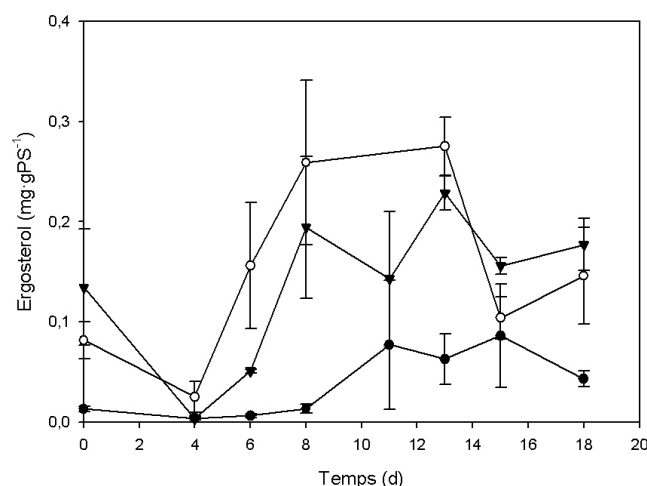


Figura 4.4. Seguiment de la concentració d'ergosterol en cultius de *T. versicolor* en matrius de sòl estèril esmenades amb els substrats **C1** —●—, **C2** —○— i **C3** —▼—. Les barres d'error representen l'error estàndard.

El substrat **C2** experimenta un ascens des del dia 4 fins el 8 de $0.234 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ d'ergosterol, moment en el qual incrementa lentament i assoleix el seu màxim el dia 13 ($0.275 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$). A partir d'aquí, es dona un descens situant-s'ha, finalment, a $0.165 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 18. En termes generals, el substrat **C2** és el que presenta una major concentració d'ergosterol per gram de matriu seca entre els dies 4 i 13, però el dia 18 es pot considerar que s'equipara a **C3**. Anteriorment, en l'experiment amb només substrats (figura 4.2.), el **C2** presentava una menor concentració d'ergosterol respecte **C3** a excepció dels dies 7 (on tots dos s'igualaven), 14 i 17. Altrament, el comportament de l'ergosterol de **C2** en la colonització de substrats no és tant oscil·lant com en aquest experiment i es pot observar un increment sostingut des del dia 5.

El substrat **C3** és el que presenta una major concentració d'ergosterol el dia 0 ($0.134 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$) però és el que té un major descens al dia 4 ($0.003 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$). Posteriorment i fins el dia 8 hi ha un ascens que es veu afectat el dia 11 per un lleuger descens de $0.051 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, però tenint en compte l'error associat a la mesura es pot considerar que aquest es va mantindre practicamente constant. El dia 13 assoleix el seu màxim d'ergosterol ($0.229 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$), a partir del qual descendeix fins el dia 18 amb un valor final de $0.177 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$. En l'anterior experiment de colonització de substrats, **C3** era el substrat que presentava, de forma general, una major concentració d'ergosterol per gram, de pes sec, de matriu sòlida, però a diferència de **C2** aquest sí que segueix un comportament similar en tots dos experiments: presenta un descens important abans

d'assolir el màxim d'ergosterol per, tot seguit, tornar a disminuir i mantindre's més o menys estable al voltant d'un cert valor. Comportaments similars s'han observat durant la colonització de llocs de depuradores en sistemes de fase sòlida similars (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010).

El substrat **C1** és el que presenta una menor concentració d'ergosterol en tots els dies de mesura. A diferència dels altres dos substrats, i com ja s'ha comentat, és el que presenta una fase de latència més llarga, fins el dia 6. A partir d'aquí segueix una tendència similar a la del substrat **C3** retrasada dos dies, assolint un màxim de $0.086 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 15, a partir del qual descendeix fins una concentració final de $0.043 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ d'ergosterol. A diferència del subapartat 4.3.1. on **C1** disminuïa gradualment des del valor màxim inicial, aquí presenta un seguit d'oscil·lacions però els valors són molts pròxims als de la colonització de substrats.

4.4.2. Producció lacasa

Com en l'experiment anterior s'ha mesurat l'activitat lacasa per avaluar el sistema enzimàtic de *T.versicolor* però en aquest cas en matrius de sòl-substrat en condicions estèrils. A la figura 4.5. es presenten els resultats obtinguts referents a la producció de lacasa en sòl estèril.

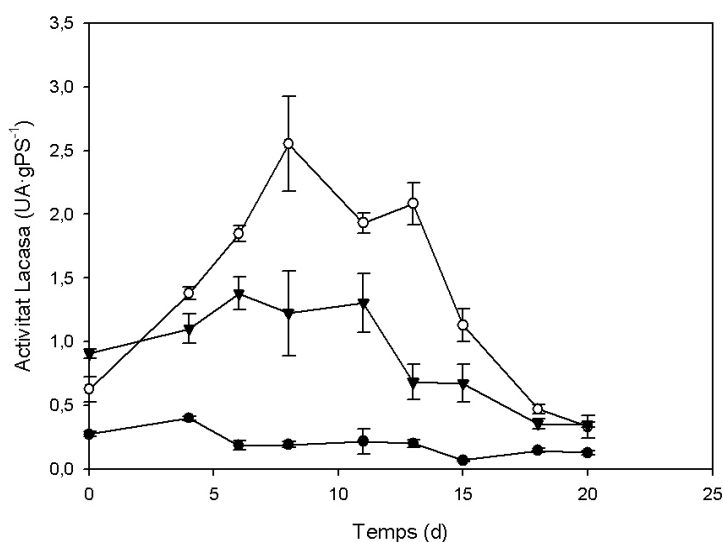


Figura 4.5. Seguiment de l'activitat lacasa en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl estèril esmenades amb els substrats **C1** —●—, **C2** —○— i **C3** —▼—. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Tal i com succeïa en al subapartat 4.3.2. (figura 4.3.), el substrat **C2** és el que presenta una major activitat lacasa, assolint un màxim de $2.553 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 8 però a

diferència de l'experiment de colonització de substrats, en aquest presenta una activitat de lacasa inferior (4.8 vegades inferior, entre els màxims de cada prova). Entre el dia 0 i 8 es detecta el nivell més elevat, a partir del qual comença a disminuir. Des del dia 0 fins el dia 13 la tendència de **C2** en sòl estèril és similar a la tendència que presentava a la figura 4.3. des del dia 3 fins el 16. Però en la figura 4.5. es pot observar que a partir del dia 13 continua descendant, assolint un valor final de $0.332 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 20, molt pròxim al de **C3** al mateix dia.

El substrat **C3** presenta una activitat lacasa superior a la de **C2** el dia 0 ($0.906 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$), però a partir d'aquí la seva activitat és menor. **C3** assoleix nivells de $1.380 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ els dies 6 i 8. Finalment, l'activitat lacasa acaba decreixent fins a $0.348 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 20. Tot i que la seva tendència en la colonització de substrats és més oscil·lant que en la colonització de sòl estèril, s'assoleixen valors màxims molt propers.

Per la seva part, el substrat **C1** és el que presenta una menor activitat de lacasa en la colonització de sòl estèril. Aquest substrat és el primer de tots tres en assolir el seu màxim d'activitat, el dia 4 amb un valor de $0.400 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$. A partir del dia 6 i fins el dia 13 es manté constant al voltant d'un interval de $0.200 \pm 0.018 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ i assoleix un valor final de $0.128 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 20. En l'anterior experiment de colonització de substrats, **C1** havia obtingut valors d'activitat més elevats i una tendència decreixent més lenta que en sòl estèril, sense observar-se que la mesura s'estabilitza al voltant de cap valor.

En general, s'observa que hi ha poder oxidatiu de tots els cultius (amb totes les mesclas de sòl-substrat estudiades) en el transcurs de tot el període d'estudi.

4.5. Colonització del sòl no estèril

Fins aquest moment tots els experiments estaven dirigits a buscar i triar els substrats que potenciaven el creixement del *T.versicolor* en diferents matrius en condicions estèrils. A la segona part d'aquesta fase experimental es busca avaluar el comportament del fong en condicions no estèrils, més pròximes a la realitat d'un procés de bioremediació. A escala pilot es pot treballar en condicions d'esterilitat però a la pràctica és impossible, donat els alts costos que comportarien i que farien inviable qualsevol procés de micoremediació. És per aquest motiu que s'ha optat per repetir l'experiment exposat a l'apartat 4.4. però treballant amb un sòl no estèril. El fet de realitzar el mateix procés experimental permet un alt grau de comparació entre resultats.

4.5.1. Seguiment ergosterol

El seguiment de l'ergosterol en sòl no estèril es pot observar a la figura 4.6. Tal i com a succeït amb les anteriors proves, el substrat **C1** es el que presenta una menor concentració d'ergosterol en el transcurs de tot l'experiment i els resultats obtinguts en sòl no estèril es corresponen amb la tendència observada en sòl estèril (figura 4.4.) des del dia 0 fins el 11. Parteix d'un valor inicial (dia 0) de $0.026 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ a partir del qual va ascendint gradualment fins assolir un valor final i màxim de $0.105 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 13.

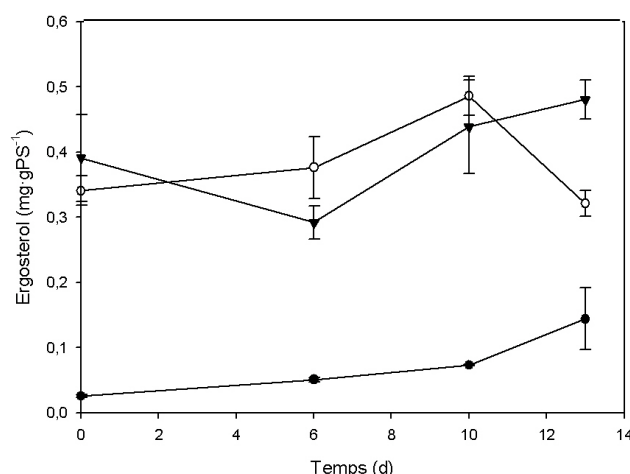


Figura 4.6. Concentració d'ergosterol en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl no estèril esmenades amb els substrats **C1** ●, **C2** ○ i **C3** ▼. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Els substrats **C2** i **C3** també presenten una tendència conjunta molt similar a l'observada en sòl estèril però amb uns valors de concentració d'ergosterol superiors. Com al subapartat 4.4.1 (figura 4.4) **C3** és el que presenta una major concentració el dia 0, amb un valor de $0.391 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ seguit per **C2** amb $0.341 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$. Posteriorment **C3** disminueix lleugerament el dia 6 ($0.292 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$) per tornar a créixer el dia 10, fins assolir el seu màxim de $0.481 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 13. En canvi, **C2** augmenta des del dia 0 fins el 10, quan assoleix el seu màxim de $0.486 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, moment en el qual disminueix fins assolir un valor final de $0.321 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 13.

Com ja s'ha exposat, les tendències en la concentració d'ergosterol de tots tres substrats és molt similar en sòl estèril i no estèril, però els seus valors, tant màxims com mínims, són força més elevats en sòl no estèril. En canvi, en la colonització de substrats s'havien observat unes tendències més irregulars, oscil·lants, en el transcurs de les

proves, però amb uns valors màxims superiors que en sòl estèril i inferiors als obtinguts en sòl no estèril. Altrament, els valors màxims obtinguts en substrats es donen a temps més llunyans, el dia 17 pels substrats **C2** i **C3**. El substrat **C1** és el que presenta un comportament més diferent respecte l'experiment de colonització de substrats i els de colonització de sòls, estèrils i no estèrils. En el primer cas presentava un valor màxim el dia 3 a partir del qual disminuïa i en les colonitzacions de sòl, en canvi, presentava els valors més baixos en els primers temps, a partir dels quals creixia, assolint valors finals superiors als inicials.

4.5.2. Producció lacasa

A la figura 4.7. es presenten les dades obtingudes en la mesura de l'activitat lacasa en sòl no estèril esmenat amb els substrats **C1**, **C2** i **C3** al llarg de 13 dies amb 4 punts de mostreig.

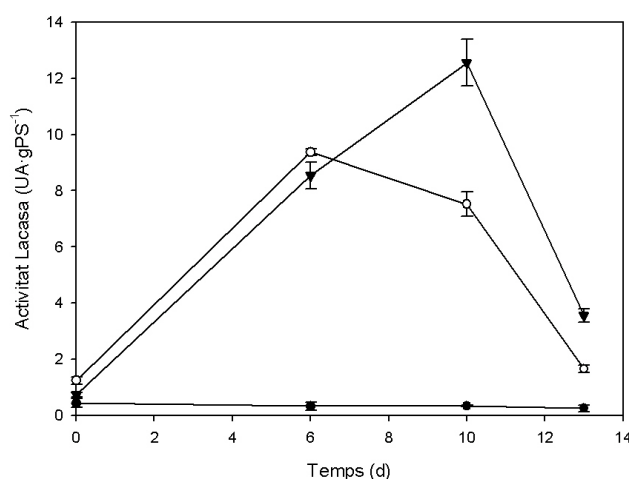


Figura 4.7. Activitat lacasa en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl no estèril esmenades amb els substrats **C1** ●, **C2** ○ i **C3** ▼. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Tal i com es pot apreciar, els resultats obtinguts per **C2** i **C3** són força superiors als obtinguts en sòl esteril. Tots dos substrats experimenten un fort creixement de l'activitat lacasa durant els primers dies, partint d'uns valors inicials (dia 0) de 1.243 UA·gPS⁻¹ i de 0.732 UA·gPS⁻¹, per **C2** i **C3** respectivament. **C2** assoleix el seu màxim el dia 6 (9.376 UA·gPS⁻¹) a partir del qual descendeix gradualment fins assolir un valor final de 1.655 UA·gPS⁻¹ el dia 13. El substrat **C3** experimenta un ascens de l'activitat lacasa fins el dia 10, moment en el qual assoleix un màxim de 12.554 UA·gPS⁻¹, però al dia 13 descendeix bruscament fins un valor final de 3.550 UA·gPS⁻¹. En l'anterior experiment

s'havia observat que l'activitat lacasa de **C2** era superior a la de **C3** en gran part dels punts de mostreig, però en sòl no estèril es pot observar que **C3** és el que assoleix un màxim més elevat, tot i que inicialment i durant els 6 primers dies és **C2** el que presenta una major activitat.

Tal i com ha succeït en els posteriors experiments, **C1** és el que presenta una menor activitat lacasa respecte **C2** i **C3** i s'observa que els valors i tendència que pren en sòl estèril i no estèril són força similars. Els nivells de lacasa detectats són menyspreables al llarg de tot l'experiment amb valors inferiors a 1 UA·gPS⁻¹. Per tant els nivells enzimàtics detectats per **C1** són molt inferiors als altres. L'activitat lacasa en tots tres experiments és la que presenta unes majors variacions si es comparà amb els resultats de l'ergosterol. A grans trets es podria dir que el substrat **C2** és el que dona una major activitat en els primers temps de les proves i que, per tant, afavoreix que el fong excreti l'enzim. **C3** segueix una tendència paral·lela a la de **C2** normalment inferior, excepte per la colonització de sòl no estèril. En canvi, **C1** és el que presenta una menor activitat lacasa i uns màxims més inferiors de forma general en tots tres experiments.

S'ha demostrat que la interacció entre microorganismes i *T.versicolor* en sòl no estèril provocava un augment de l'activitat lacasa. Els fongs de podridura blanca, en el medi natural, tenen de competir amb altres organismes per tal de colonitzar el medi i obtenir els recursos necessaris. Aquest tipus de fongs s'usen dels substrats ligninocel·lulòsics i del seu sistema enzimàtic extracel·lular per tal de prevenir i fer decreixer les poblacions microbianes presents en els sòls. Per tant, l'augment de l'excreció de la lacasa és una resposta a les interaccions de *T.versicolor* amb altres microorganismes, tot i que no s'ha pogut determinar si aquesta actua com un inhibidor de la resta de microorganismes (Baldrin, 2004). Els resultats obtinguts en sòl estèril i no estèril corroboren aquest fet, amb uns valors de l'activitat lacasa un ordre de magnitud superior en sòls no estèril que en sòls estèrils.

4.6. Capacitat de degradació del fong en medi sòlid

Com a mesura de la capacitat degradativa de *T.versicolor* en sòl estèril i no estèril es va optar per utilitzar el test ND24 definit per Rodríguez-Rodríguez (2010), basat en la degradació del naproxè inoculat en cultius d'aquest fong durant 24 h, utilitzant cultius inactivats per calor com a blanc. La figura 4.8. mostra els resultats obtinguts en la prova del ND24 per *T.versicolor* en sòl estèril i no estèril.

La degradació del naproxé per *T.versicolor* en sòl estèril (figura 4.8.a) mostra que el substrat **C1** és el que presenta un major percentatge de degradació, assolint uns valors del 46.7% el dia 11 i del 48.3% el dia 20. **C2** presenta el seu màxim de degradació el dia 11, amb un 24.4%, el qual disminueix fins el 11.9% el dia 20. En canvi, **C3** té un percentatge de degradació més baix el dia 11 (11.5%) i més alt el dia 20, amb un valor del 21.4%.

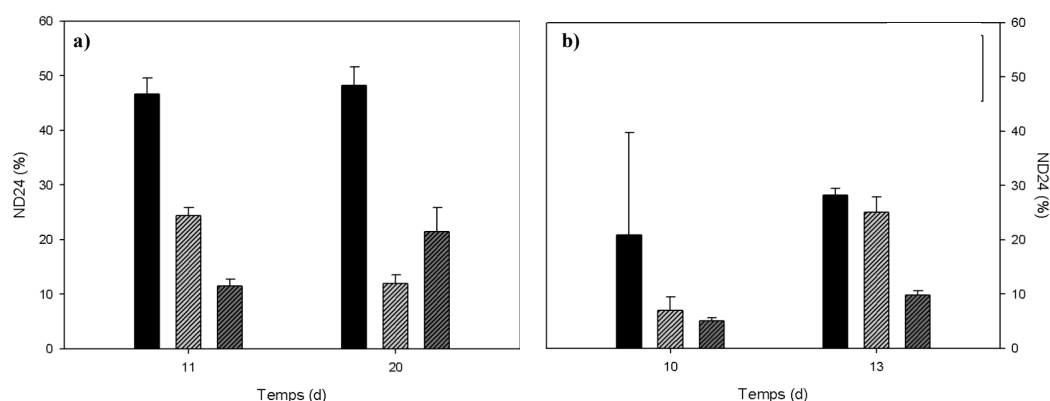


Figura 4.8. Degradació del naproxé (ND24) per *T.versicolor* en cultis amb **a)** sòl estèril i **b)** sòl no estèril, esmenats amb els substrats **C1**, **C2** i **C3**. Les barres d'error representen la desviació estàndard. La degradació està expressada com a percentatge respecte cultius inactivats per calor.

La degradació en sòl no estèril (figura 4.8.b) és sensiblement inferior que en sòl estèril. **C1** torna a ser el substrat amb una major degradació, amb un 20.9% el dia 10 i un 28.2% el dia 13. **C2** presenta una degradació del 6.9% el dia 10 i del 25.1% el dia 13. Finalment, **C3** dona uns valors de degradació del 5.1% el dia 10 i del 9.9% el dia 13. Com en el cas anterior, i considerant el percentatge acumulat de degradació del naproxé, amb **C1** es presenta una major degradació, seguit de **C2** i **C3**, respectivament.

Amb els anteriors mètodes es podia pensar que els substrats **C2** i **C3** eren els més idonis per al creixement i maximització de la producció de lacasa per *T.versicolor*, però amb aquest test es pot provar que el substrat **C1** és més indicat per al seu possible ús en tractaments de micoremediació. Però cal tindre present que la degradació avaluada amb aquest mètode és per un compost específic i que, per tant, el comportament de *T.versicolor* davant d'altres contaminants pot donar lloc a resultats diferents dels aquí exposats.

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

S'ha avaluat la possibilitat de fer créixer el fong *Trametes versicolor* sobre substrats ligninocel·lulòsics i s'ha pogut determinar que els substrats **C1**, **C2** i **C3** són els millors pel creixement de *T.versicolor*, tant en termes de producció de CO₂, com de biomassa i de producció lacasa.

Empreant un substrat precolonitzat s'ha estudiat la capacitat del fong per colonitzar sòls en condicions estèrils. Els resultats evidencien que *T.versicolor* és capaç de colonitzar el sòl estèril a partir de substrats precolonitzats, amb els tres substrats emprats i d'acord amb l'expressió enzimàtica de lacasa i les unitats de biomassa.

Igualment, *T.versicolor* ha estat capaç de colonitzar el sòl no estèril a partir dels substrats **C1**, **C2** i **C3** precolonitzats, obtenint uns valors de biomassa d'igual magnitud que en sòl estèril.

La mesura de l'enzim extracel·lular lacasa és un indicador d'activitat metabòlica del fong i que en molts casos s'associa a la capacitat de degradació de compostos recalcitrants i la interacció amb altres microorganismes. La producció de lacasa en condicions no estèrils és major que en condicions estèrils pels 3 substrats estudiats en experiments de colonització de sòls.

Finalment, la capacitat degradativa del fong en sòls precolonitzats s'ha avaluat mitjançant una novedosa tècnica que consisteix en avaluar la degradació del naproxé en un període de 24 h i s'ha comprovat que *T.versicolor* es capaç de degradar-lo en els tres substrats, tant en condicions estèrils com no estèrils, tot i que les expressions de lacasa i biomassa eren més baixes a la dels altres substrats. Els millors percentatges s'obtenen amb el substrat **C1**.

Malgrat estar descrit que *T.versicolor* no és un fong típicament emprat per bioremediació de sòls per la seva dificultat en créixer-hi, amb aquest treball s'evidencia que empreant un substrat ligninocel·lulòsic adequat *T.versicolor* pot colonitzar el sòl i mantenir la capacitat degradativa, equiparable a la que tindria per aigües residuals.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Bååth, E. (2001) *Estimation of fungal growth rates in soil using ^{14}C -acetate incorporation into ergosterol*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 33, pp. 2011-2018

Bååth, E., i Anderson T.-H. (2003) *Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 35, pp. 955-963

Baldrin, P. (2004) *Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi*. Microbiology Ecology, Vol. 50, pp. 245-253

Ballaminut, N., i Matheus D.R. (2007) *Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation*. Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 38, pp. 248-252.

Childress, A.M., et al. (1998) *Formulation of filamentous fungi for bioremediation*. Biotechnology Techniques, Vol. 12, No. 3, pp. 211-214.

Davis, M.W., i Lamar, R.T. (1992) *Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 24, No. 3, pp. 189-198.

Ford, C.I., et al. (2007) *Fungal inoculum properties: extracellular enzyme expression and pentachlorophenol removal by new zealand trametes species in contaminated field soils*. Journal of Environmental Quality, Vol. 36, pp. 1749-1759.

Gadd, G. M. (2001) *Fungi in Bioremediation*. Capitols: *Degradation of plant cell polymers* (Evans i Hedger, pp. 1-20) i *The biochemistry of ligninolytic fungi* (Harvey i Thurston, pp. 27-44). Cambridge University Press

Gassara, F. et al. (2010) *Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by Phanerocheate chrysosporium*. Biochemical Engineering Journal (pendent de publicació)

Högberg, M.N. (2006) *Discrepancies between ergosterol and the phospholipid fatty acid 18:2 ω 6,9 as biomarkers for fungi in boreal forest soils*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 38, pp. 3431-3435.

Jing, D., et al. (2007) *Optimization of laccase production from trametes versicolor by solid fermentation*. Canadian Journal of Microbiology, Vol. 53, No. 2, pp 245-251.

Kurt, S., i Buyukalaca, S. (2010) *Yield performances and changes in enzyme activities of pleurotus spp. cultivated on different agricultural wastes*. Bioresource Technology, Vol. 101, pp. 3164-3169.

Lestan, D. et al. (1996) *Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils*. Journal of Industrial Microbiology, Vol. 16, pp. 286-294

Lorenzo, M. et al. (2002) *Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of trametes versicolor*. Bioresource Technology.

Lorenzo, M., et al. (2002) *Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of trametes versicolor*. Bioresource Technology, Vol. 82, pp. 109-113.

Meidute, S., et al. (2008) *Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 40, pp. 2334-2343.

Mille-Lindblom, C., et al. (2004) *Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death*. Journal of Microbiological Methods, Vol. 59, pp. 253-262.

Montgomery, H.J., et al. (2000) *Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 32, pp. 1207-1217.

Morgan, P., et al. (1993) *Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 25, No. 2, pp. 279-287.

Nobuyuki, K., et al. (1995) *Correlation of Brightening with Cumulative Enzyme Activity Related to Lignin Biodegradation during Biobleaching of Kraft Pulp by White Rot Fungi in the Solid-State Fermentation System*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 61, No. 2, pp 617-622.

Novotny, C. et al. (1999) *Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi*. Biodegradation, Vol. 10, pp. 159-168

Olsson, P.A. (1999) *Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil*. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 29, pp. 303-310.

Pant, D., i Adholeya, A. (2007) *Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation*. Biodegradation, Vol. 18, pp. 647-659.

Pietikäinen, J., et al. (2005) *Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates*. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 52, pp. 49-58.

Rodríguez Couto, S., et al. (2001) *Strategies for improving ligninolytic enzyme activities in semi-solid-state bioreactors*. Process Biochemistry, Vol. 36, pp. 995-999.

Rodríguez Couto, S., et al. (2003) *Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions*. Biochemical Engineering Journal, Vol. 15, pp. 21-26.

Rodríguez Couto, S., i Sanromán, M.A. (2005) *Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production*. Biochemical Engineering Journal, Vol. 22, pp. 211-219.

Rodríguez Couto, S., i Toca-Herrera, J.L., (2006) *Industrial and biotechnological applications of laccases: a review*. Biotechnology Advances, Vol. 24, pp. 500-513.

Rodríguez Couto, S., i Toca-Herrera, J.L., (2007) *Laccase production at reactor scale by filamentous fungi*. Biotechnology Advances, Vol. 25, pp. 558-569.

Rodríguez-Rodríguez, C. E. et al. (2010) *Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes*. Journal of Hazardous Materials (*pendent de publicació*)

Ruzicka, S., et al. (2000) *The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 32, pp 989-1005.

Schmidt, K.R., et al. (2005) *Fungal inoculum properties and its effect on growth and enzyme activity of *Trametes versicolor* in soil*. Biotechnol. Prog., Vol. 21, pp. 377-385.

Singh, H. (2006) *Mycoremediation, Fungal Bioremediation*. Wiley, pp. 2-4, 16-20

Solanas, A. (2007) *La Bioremediació*. Treballs de la SCB, Vol. 58, pp. 187-202

Stahl, P.D., and Parkin, T.B. (1996) *Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass*. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 28, No.7, pp. 847-855.

Vares, T., et al. (1995) *Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of*

wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 10, pp. 3515-3520.

Wallenstein, M.D., i Weintraub, M.N. (2008) *Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes*. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 40, pp. 2098-2106.

Walter, M., et al. (2005) *Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor**. *International Biodeterioration & biodegradation*, Vol. 56, pp. 51-57.

Webster, J., i Weber, R. W. S., (2007) *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, third edition, pp. 499, 560-562

West, A.W., et al. (1987) *Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations*. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 19, No. 5, pp. 607-612.

Zafar, S.I., et al. (1996) *Influence of nutrient amendment on the biodegradation of wheat straw during solid state fermentation with *trametes versicolor**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, pp. 83-87.

Zhao, X.R., et al. (2005) *Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass?*. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 37, pp. 311-317.