

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 i Carlos Esteban Rodríguez-Rodríguez

Projecte de final de carrera de Ciències Ambientals

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 sustratos. Una primera criba basada en la producción de CO₂, la medida de la actividad lacasa i la cuantificación del ergosterol han permitido seleccionar los sustratos 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

1. Introducció

1.1. Bioremediació

La contaminació química del medi ambient ha rebut, en els últims anys, una gran atenció des de diferents sectors de les societats. 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 productes químics de nova síntesi, com combustibles, plaguicides i fàrmacs (Solanas, 2007).

La bioremediació, nascuda a la dècada dels 80 com una branca de la biotecnologia, està basada en la capacitat dels microorganismes per degradar un ampli ventall de compostos químics i preten trobar solució als actuals problemes de contaminació. Com succeeix en altres camps, la bioremediació es pot trobar limitada per diversos factors, i és imprescindible detectar-los i tindre'ls en consideració abans d'iniciar qualsevol procés de bioremediació (Solanas, 2007).

1.1.1. Micoremediació

Els fongs són un grup heterogeni de microorganismes eucariotes repartits per tot el medi ambient. És ben conegut que els fongs i els bacteris 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).

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 (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 es que no són específics per un substrat concret, cosa que permet la seva aplicació en la degradació de contaminants en una matriu. Els enzims modificadors de lignina són oxidoreductases: peroxidases i fenoloxidases (Webster i Weber, 2007).

Manganès peroxidasa: (MnP) és 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 en substrats fenòlics (Harvey i Thurston, 2001).

Lignina 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.

1.1.1.1. Monitorització de processos de micoremediació

Degut a que els fongs de podridura blanca són utilitzats en bioremediació perquè poden degradar xenobiòtics, caldra monitoritzant aquells processos propis dels fongs per tal d'avaluar el seu comportament en un procés de micoremediació, tals com:

- 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 monitorització d'aquest paràmetre al llarg del temps permetrà valorar el potencial d'oxidació del sistema fong-substrat.
- B) L'ergosterol és un dels principals esterols que formen la membrana cel·lular dels fongs filamentosos (Zhao, Lin i Brookes, 2004) i s'ha utilitzat com a mesura de la biomassa d'aquests en sòls (Seitz et

al. -1977-, Lee et al. -1980- i Matcham et al. -1985). Es tenen en compte dos factors per tal de considerar-lo 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 o altres microbis, a excepció d'algunes microalgues verdes (Davis i Lamar, 1992), i és un compost relativament inestable (Mille-Lindblom et al., 2004).

- C) El test de degradació del Naproxè (ND24), és una mesura absoluta de biodegradació basada en la capacitat de *Trametes versicolor* per degradar una petita concentració d'aquest compost (Rodríguez-Rodríguez et al., 2010). La seva degradació pot estar catalitzada per la lacasa i el citocrom P450 en *T. versicolor* (Marco-Urrea et al., 2010). Aquest test aportar informació complementària sobre l'estat fisiològic del fong i la seva capacitat degradativa.

1.1.1.2. *Trametes versicolor*

El fong *T.versicolor* (*Coriolus versicolor*) és un basidiomicet sapròfit que és habitual trobar en soques d'arbres morts. Tant els micel·lis com el basidiocarp són resistent a la dessecació i aquest últim, que pot formar un ventall de fins a 10 cm de diàmetre, presenta una superfície velluda capaç de retindre l'aigua (Webster i Weber, 2007).

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

Taula 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 farratge de blat de moro	Le'stan <i>et al.</i> (1996)
Benzol alpiré, clorobenzé, crisé, naftalé, fenols i metalls pesats	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> i <i>Marasmiellus trojanus</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	Novotný <i>et al.</i> (1999)
Fenol vermell	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Malta	Rodriguez Couto <i>et al.</i> (2001)
	<i>T. versicolor</i>	Llavors i tiges de raïm i segó d'ordi	Lorenzo <i>et al.</i> (2002)
	<i>T. versicolor</i>	Malta	Rodriguez 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 deltoides</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'arros, 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 residus de l'indústria del paper	Gassara, Brar, Tyagi, Verma i Surampalli (2010)

1.1.2. Valorització de residus lignocel·lulòsics

La valorització dels residus és un conjunt de mètodes que permeten obtenir productes estables aplicables en diferents camps. Els residus agrícoles han estat àmpliament utilitzats en estudis anteriors en el tractament de matrius sòlides contaminades amb fongs de podridura blanca. A la taula 1 es mostra un recull d'alguns d'aquests estudis.

En el present treball s'han utilitzat residus agrícoles com a substrat lignocel·lulósic pel creixement de

T. versicolor per al seu eventual us en bioremediació de sòls contaminats. Es van utilitzar dos tipologies de residus agrícoles diferents: residus tractats o processats (subproductes que han sofert algun procés industrial) i residus no tractats.

2. Objectiu

Desenvolupar l'estrategia de colonització d'un sòl per *T. versicolor* mitjançant l'addició de substrats lignocel·lulòsics mitjançant: la caracteritzar dels substrats, l'avaluació de la capacitat de colonització dels substrats per *T. versicolor* considerant la producció de diòxid de carboni, lacasa i ergosterol, l'estimació de la capacitat de *T. versicolor* per colonitzar sòl estèril i no estèril i valorant la capacitat degradativa de *T. versicolor*.

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_{aq} 5.1, pH_{KCl} 4.5, 2% de matèria orgànica, 77.35% de sorra, 2.10% de llim,

10.55% d'argila, Corg 1.28%, 0.12% Ntot 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 micel·lial 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 $\text{pH}_{\text{aq}}^{\text{aq}}$ i del pH_{KCl}

Per mesurar el $\text{pH}_{\text{aq}}^{\text{aq}}$ 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 $\text{pH}_{\text{aq}}^{\text{aq}}$ 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 els 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 ($\text{mg}\cdot\text{gPS}^{-1}$).

3.5.6. Degradació del Naproxè (ND24)

Es va utilitzar una prova basada en la degradació del naproxè 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 naproxè 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 naproxè va ser verificada previament per aquest mètode (>95%).

3.5.7. Quantificació del Naproxè

Els anàlisis de naproxè 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 mL·min⁻¹ (Stafiej *et al.*, 2007). El temps de retenció va ser aproximadament de 14.1 min.

3.5.8. Mesures de CO₂

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 cops 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 cromatògraf 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 afegir 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 prendre 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'expressa 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).

4. Resultats i Discussió

Els experiments realitzats es van dividir en tres fases: a la primera fase es planteja com 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, la segona fase experimental preten avaluar la capacitat del fong per colonitzar sòls esmenats amb els substrats, i a la tercera, i última, fase s'avalua la capacitat degradativa d'un compost químic per *T.versicolor* en sòl.

4.1. Selecció dels substrats

4.1.1. Caracterització dels substrats

A la taula 2 es presenten les principals propietats fisicoquímiques dels 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. 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 2 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, 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.

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 2, el substrat *C3* és l'únic que es troba dintre d'aquest rang, però els substrats *C1* i *C2* hi estan bastant pròxims. En aquest cas, el nitrogen és el component 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.

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 és una mesura de la porositat aparent de cada substrat i, per tant, de la capacitat de cadascun per retindre aigua per capilaritat. El fong necessita de la presència d'aigua en el medi però també en produeix en la respiració. Cal seleccionar els substrats que permetin una bona disponibilitat d'aigua, però evitant que n'hi hagi en excés ja que es podrien afavorir altres organismes que entrieren en

competència amb *T.versicolor* (Baldrin, 2004).

4.1.2. 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 produïnt, entre d'altres, aigua i diòxid de carboni. Tal i com es pot apreciar a la figura 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. En tots 7 substrats s'observa una fase de latència durant les primeres 24 h posterior a l'inoculació del fong.

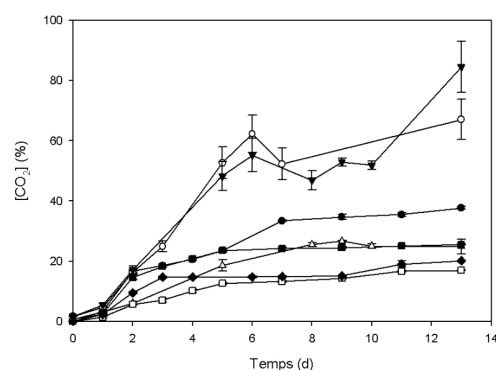


Figura 1 Acumulació del CO₂ al llarg del temps pels diferents substrats: *C2* —○—, *C3* —△—, *C1* —●—, *Pa* —■—, *Pn* —▲—, *Se* —□— i *Ar* —◆—. Concentració expressada com a percentatge respecte el volum total d'aire. Graus d'humitats al 60%. Les barres d'error representen l'error estàndard.

El primer grup, format pels substrats **C2** i **C3** són els que presenten els valors de concentració de CO₂ màxims. La fase de creixement en aquests dos substrats és més prolongada que en la resta i no s'estabilitzen fins el dia 6-8, amb un valor de 46.9% CO₂ per tots dos. Posteriorment, s'observa un augment de la concentració el dia 13, assolint-se valors màxims de CO₂ del 67.1% per **C2** i del 84.6% per **C3**.

El segon grup, format pels substrats **C1**, **Pa**, **Pn**, **Se** i **Ar**, entre els dies 1 i 5 es dona una fase de creixement exponencial, assolint unes concentracions màxims de CO₂ del 37.7% pel substrat **C1** (dia 13), 25.5% pel substrat **Pa** (dia 13), 26.7% pel substrat **Pn** (dia 9), 17.0% pel substrat **Se** (dia 13) i 20.1% pel substrat **Ar** (dia 13).

Es va realitzar un primer triatge dels substrats en funció del CO₂ produït, assumint que està relacionat amb la capacitat de *T.versicolor* per assimilar

cada substrat. Es va decidir no utilitzar en els posteriors experiments els substrats **Se** i **Ar** perquè donaven una menor concentració de CO₂ durant la fase de manteniment del fong.

4.1.3. Colonització dels substrats

A la segona part d'aquesta fase experimental es va estudiar el comportament del fong sobre els substrats seleccionats anteriorment en condicions estèrils. Es va monitoritzar el creixement del fong mitjançant el seguiment de la biomassa viable en els substrats a través de la quantificació de l'ergosterol i es va fer un seguiment del seu sistema enzimàtic extracel·lular a partir del seguiment de l'activitat lacasa.

A la figura 2.a 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.

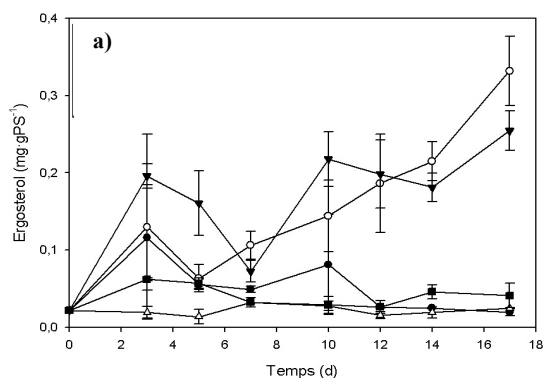
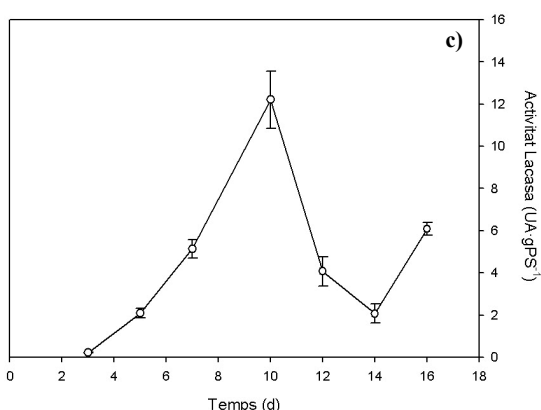
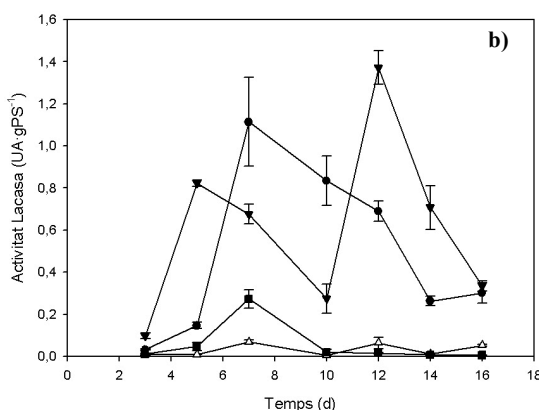


Figura 2 a) Seguiment de la concentració d'ergosterol en cultius de *T.versicolor* en 3 g de substrats. El dia 0 el valor d'ergosterol és teòric, considerant que 1 mL de solució micel·lial té una concentració de biomassa de 0.05 g. **b)** Seguiment de l'activitat lacasa en cultius de *T.versicolor* en els substrats: **C1** (●), **C3** (▼), **Pn** (▲) i **Pa** (■) i **c)** **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 **C2** i **C3** segueixen una mateixa tendència. 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 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. En 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 d'aquest el nivell d'ergosterol de **C1** 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.

A la figura 2.b i 2.c es representen els valors d'activitat lacasa obtinguts en *T.versicolor* inoculat sobre substrat estèril.

El substrat **C2** (figura 2.c) és el que presenta una major activitat lacasa, 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 i que el decreixement en l'activitat es pot atribuir a la desactivació del sistema enzimàtic.

Els substrats **C1** i **C3** (figura 2.b) són els següents en presentar una major activitat lacasa 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** (figura 2.b) 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.

Amb les mesures de CO_2 s'havia observat que els substrats **C2** i **C3** eren els que en presentaven una major concentració, 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 i l'activitat lacasa s'ha observat una tendència similar. Es va decidir no utilitzar les substrats **Pa** i **Pn** en els posteriors experiments per dos motius: perquè són els substrats que presenten una menor biomassa viable de fong i són els substrats on la lacasa ha estat força més baixa. Una major biomassa viable de fong és necessària al treballar amb sòl per tal que, en el moment de la seva addició, estigui en unes condicions òptimes que li permetin afrontar les noves condicions de l'ambient i colonitzar-lo amb èxit mantenint la capacitat degradativa. Per altra part, 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, està implicada en la degradació de diversos pollutants.

4.2. Colonització de sòl

A la segona fase experimental es va estudiar el comportament de *T.versicolor* sobre sòl, estèril i no estèril, esmenat amb els substrats seleccionats. Es van fer servir cultius de *T.versicolor* precrescuts en substrats estèrils als quals se'ls va addicionar sòl en el moment d'iniciar els experiments. S'ha monitoritzat l'ergosterol i la lacasa per avaluar l'estat de *T.versicolor*.

A la taula 3 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 3 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

4.2.1. Colonització de sòl estèril

A diferència de la colonització de substrats es pot apreciar que els valors inicials d'ergosterol (dia 0) (figura 3.a) disminueixen per tots tres substrats fins

el dia 4 degut a l'addició de sòl estèril en cultius de 7 dies d'antiguitat. La fase de latència, que pels substrats *C2* i *C3* dura fins el dia 4 i per *C1* fins el dia 6, és deguda al procés d'addició i homogenització de la matriu substrat-sòl. Com en la colonització sobre substrats, les tendències de l'ergosterol són oscil·lants però segueixen una tendència comuna.

El substrat *C2* és el que presenta una major concentració d'ergosterol per gram de matriu seca entre els dies 4 i 13, moment en el qual assoleix el seu màxim (0.275 mg·gPS⁻¹). Però a partir del dia 15 descendeix i es pot considerar que s'equipara a *C3* el dia 18. El substrat *C3* és el que presenta una major concentració d'ergosterol el dia 0 (0.134 mg·gPS⁻¹) però és el que té un major descens al dia 4 (0.003 mg·gPS⁻¹). Posteriorment i fins el dia 8, hi ha un ascens que es veu afectat el dia 11 per un lleuger descens, però el dia 13 assoleix el seu màxim d'ergosterol (0.229 mg·gPS⁻¹), a partir del qual descendeix fins el dia 18 amb un valor final de 0.177 mg·gPS⁻¹. En canvi *C1* és el que presenta una menor concentració d'ergosterol en tots els dies de mesura i una fase de latència més llarga, fins el dia 6. A partir d'aquí segueix una

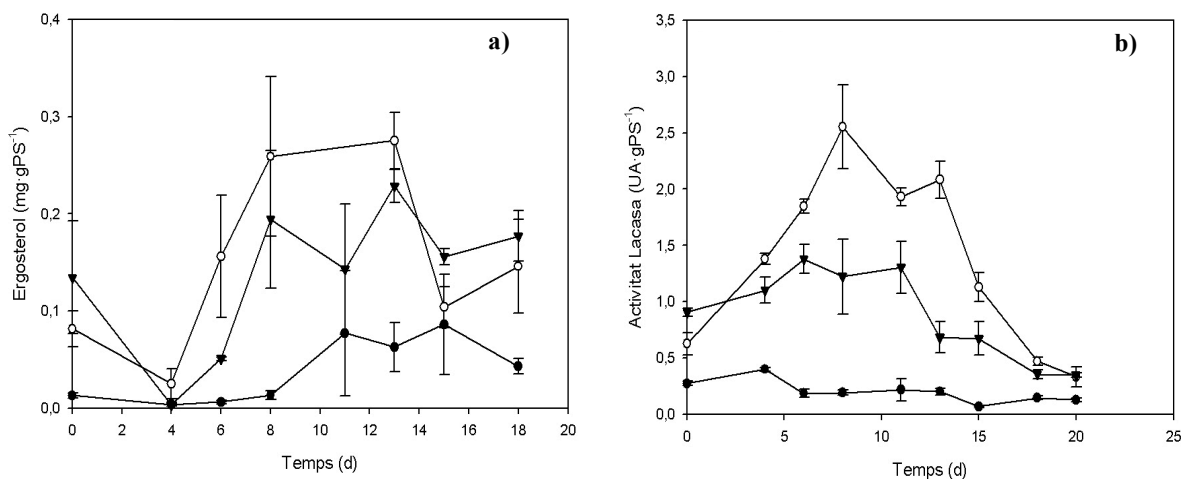


Figura 3 a) Seguiment de la concentració d'ergosterol en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl estèril esmenades amb els substrats *C1* (●), *C2* (○) i *C3* (▼). **b)** Seguiment de l'activitat lacasa en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl estèril esmenades amb els mateixos substrats. Les barres d'error representen l'error estàndard.

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.

En la colonització de substrats **C2** presentava una menor concentració d'ergosterol respecte **C3** a excepció dels dies 7, 14 i 17 i el seu comportament no era tant oscil·lant. En canvi, **C3** té un comportament similar en tots dos experiments però anteriorment havia presentat, de forma general, una major concentració d'ergosterol per gram, de pes sec, de matriu sòlida. Comportaments similars s'han observat durant la colonització de llots de depuradores en sistemes de fase sòlida similars (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2010). Per la seva part, **C1** en l'experiment de colonització de substrats disminuïa gradualment des del valor màxim inicial, en canvi en la colonització de sòl estèril presenta un seguit d'oscil·lacions però els valors són molts pròxims als de la colonització de substrats.

L'activitat lacasa en sòl estèril (figura 3.b) és la que presenta unes diferències més significatives entre els experiments de colonització de substrats i de sòl estèril. El substrat **C2** és el que presenta, en termes generals, 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, aquí presenta una activitat de lacasa 4.8 vegades inferior (respecte els màxims de cada prova). Entre els dies 0 i 8 es quan es detecten els nivells més elevats de lacasa, però a partir del dia 13 descendeix fins assolir 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, assolint nivells màxims de $1.380 \text{ UA} \cdot \text{gPS}^{-1}$ els dies 6 i

8; a partir dels quals descendeix fins al final de l'experiment. Finalment, **C1** és el que presenta una menor activitat de lacasa. 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 finalment descendeix fins el dia 20.

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.

4.2.2. Colonització de sòl no estèril

A escala pilot es pot treballar en condicions d'esterilitat però a la pràctica és poc provable, donat els alts costos que farien inviable qualsevol procés de micoremediació. És per aquest motiu que s'ha optat per repetir l'experiment anterior (subapartat 4.2.1) però treballant amb un sòl no estèril.

A la figura 4.a és mostren els resultats obtinguts en el seguiment de l'ergosterol en sòl no estèril. El substrat **C3** és el que presenta una major concentració el dia 0 ($0.391 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$), seguit per **C2** ($0.341 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$) i **C1** ($0.026 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$). Els substrats **C2** i **C3** presenten una tendència conjunta molt similar a l'observada en sòl estèril però amb uns valors de concentració d'ergosterol superiors. **C3** disminueix des del valor inicial fins el dia 6, on comença a ascendir fins assolir un màxim de $0.481 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 13. En canvi, **C2** ascendeix des del dia 0 fins el dia 10, quan assoleix el seu màxim de $0.486 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$, moment en el qual disminuïra fins assolir un valor final de $0.321 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ el dia 13. Per la seva part, **C1** és el que presenta una menor concentració d'ergosterol en el transcurs de tot l'experiment. Parteix d'un valor inicial de $0.026 \text{ mg} \cdot \text{gPS}^{-1}$ (dia 0) 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.

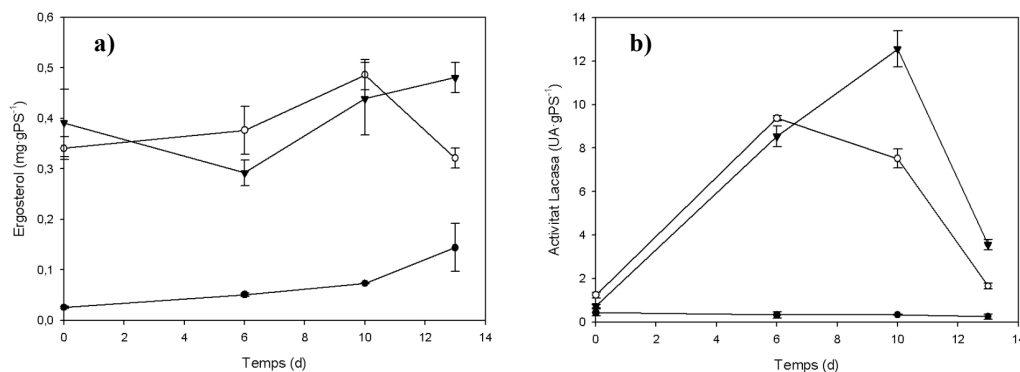


Figura 4 a) Seguiment de la concentració d'ergosterol en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl no estèril esmenades amb els substrats **C1** —●—, **C2** —○— i **C3** —▲—. b) Seguiment de l'activitat lacasa en cultius de *T.versicolor* en matrius de sòl no estèril esmenades amb els mateixos substrats. Les barres d'error representen l'error estàndard.

Les tendències en la concentració d'ergosterol de tots tres substrats és molt similar en sòl estèril i no estèril, però els seus valors són força més elevats en sòl no estèril. En la colonització de substrats s'havien observat unes tendències més irregulars en el transcurs de les proves, però amb uns valors màxims superiors que en sòl estèril i inferiors als obtinguts en sòl no estèril. El substrat **C1** és el que presenta un comportament més diferent respecte l'experiment de colonització de substrats. En els substrats presentava un valor màxim el dia 3 a partir del qual disminuïa i en sòls presenta els valors més baixos en els primers temps, a partir dels quals creix.

A la figura 4.b és mostren els resultats obtinguts en quant a l'activitat lacasa en sòl no estèril. 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, respectivament. El substrat **C2** assoleix el seu màxim el dia 6 (9.376 UA·gPS⁻¹) a partir del qual descendeix gradualment fins un valor de 1.655 UA·gPS⁻¹ el dia 13 i **C3** experimenta un ascens de l'activitat lacasa fins el seu màxim (12.554

UA·gPS⁻¹) el dia 10, però al dia 13 descendeix bruscament fins un valor final de 3.550 UA·gPS⁻¹. El substrat **C1** és el que presenta una menor activitat lacasa 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.

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 s'usen del seu sistema enzimàtic extracel·lular per prevenir i fer decreixer les poblacions microbianes presents en els sòls. Per tant, l'augment de l'excrecció 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.

4.3. 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 utilitzar el test ND24, definit per Rodríguez-Rodríguez (2010). La figura 5 mostra els resultats obtinguts en la prova del ND24 per *T.versicolor* en sòl estèril i no estèril.

En sòl estèril (figura 5.a) **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 (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 (21.4%).

En sòl no estèril (figura 5.b) **C1** té 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.

Els resultats anteriors podien fer 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 el comportament de *T.versicolor* davant d'altres contaminants pot donar lloc a resultats diferents dels aquí exposats.

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 empreats 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

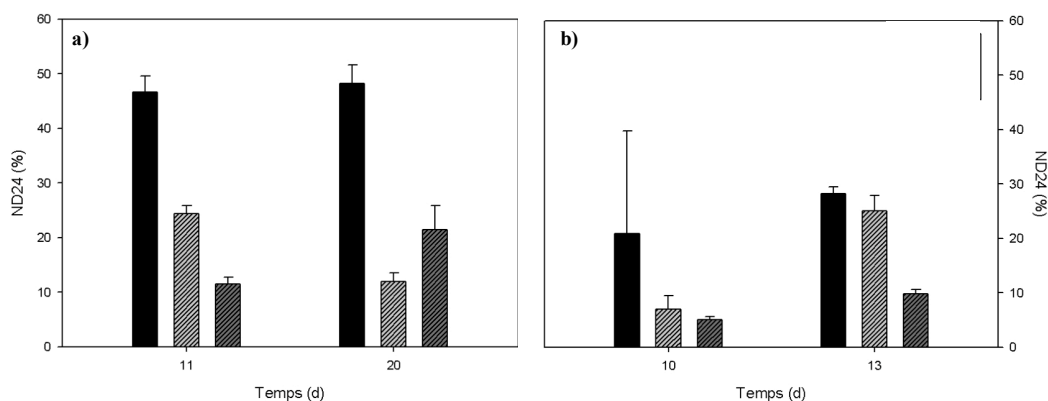


Figura 5 Degradació del naproxé (ND24) per *T.versicolor* en cultius amb **a)** sòl estèril i **b)** sòl no estèril, esmenats amb els substrats **C1** ■, **C2** ▨ i **C3** ▩. Les barres d'error representen la desviació estàndard. La degradació està expressada com a percentatge respecte cultius inactivats per calor.

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 expresions de lacasa i biomassa eren més baixes a la dels altres substrats. Els millors percentatges s'obtenen amb el substrat **CI**.

Malgrat estar descrit que *T.versicolor* no és un fong típicament emprat per

bioremediació de sòls per la seva dificultat en creixer-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.

6. 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.

7. 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 activites 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.