

Producció de biomassa del fong *Trametes versicolor* en un reactor de tanc agitat

(resum)

Miquel Palou

Directora: Teresa Viscent

Tutora: Paqui Blaquez

Resum del projecte final de carrera
de ciències Ambientals



Universitat Autònoma
de Barcelona

Introducció

Aquest projecte s'ha centrat en la producció de biomassa del fong *Trametes versicolor* per a què pugui dur a terme funcions de bioremediació.

Es pot definir la bioremediació en termes generals com: La utilització de la capacitat de biodegradació de microorganismes i plantes per descontaminar el medi (Rittmann i McCarty, 2000). Hi ha dos vies principals per les quals un contaminant pot ser modificat, la via metabòlica on s'utilitza el contaminant com a font de carboni o energia, en la qual actuen majoritàriament enzims intracel·lulars. I la via cometabòlica on es transforma de forma fortuïta el contaminant per enzims produïts pel microorganisme en presència d'un substrat de creixement. El contaminant no es utilitza com a font de carboni ni energia i els enzims habitualment són extracel·lulars.

La micoremediació és el procés d'utilització de fongs i/o els seus enzims per degradar contaminants del medi. 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 micelis. En condicions òptimes, els micelis reproductors donen lloc a espores, la germinació de les quals dóna lloc a unes noves estructures anomenades hifes. Principalment els fongs són degradadors de matèria orgànica, els fongs ligninolítics com el *Trametes versicolor* en són un exemple. Els enzims modificadors de lignina són oxidoreductases, els quals poden ser peroxidases (manganès peroxidasa i lignin peroxidasa) i fenoloxidasas (lacasa).

Trametes versicolor és un fong anomenat popularment "cua de gall d'indi" que habita sobre troncs morts i en provoca la podridura blanca. Tot i que es pot trobar tot l'any, la època en que és més fàcil de veure és cap a la tardor, ja que és l'època en que allibera les espores. En canvi, en condicions de laboratori *Trametes versicolor* pot créixer de forma dispersa (miceli) o de forma compacta (pèl·let). Generalment els treballs amb cultius submergits amb el fong es fan en forma de pèl·let.

Trametes versicolor està sent investigat en molts laboratoris del món, ja que produeix una sèrie d'enzims molt útils per al tractament de certs residus i/o

contaminants, per exemple: hidrocarburs policíclics aromàtics (PHA) (Majcherczyk i col. 1998), una gran varietat de colorants (Blánquez i col., 2004; Casas i col., 2007; Casas i col. submitted 2012) i també medicaments com el paracetamol o el diclofenac (Marco-Urrea i col., 2010; Rodriguez-Rodriguez i col., 2011).

Objectius

L'objectiu del treball és produir biomassa de *Trametes versicolor* en condicions que s'aproximin a escala industrial, mitjançant un sol pas de cultiu en placa a reactor de tanc agitat per produir miceli.

Un cop produït el miceli es comprova la viabilitat del fong mitjançant dos tipus d'experiments:

- Decoloració en placa.
- Colonització de llots d'EDAR en biopila.

Metodologia

Per produir biomassa de *Trametes versicolor* s'inocula plugs provinents d'un cultiu en placa a un bioreactor de tanc agitat de 5 L de volum útil, amb un medi estèril de 20 g/l d'extracte de malta a pH 4,5.

Per comprovar la viabilitat del fong produït s'inocula aquest en plaques de petri amb diferents medis amb colorants (Orange G, Methilene Blue i Gris Lanaset G). També s'inocula el fong produït en dos suports ligninolítics diferents (branques d'olivera, pinso per a conills), que un cop colonitzats s'hi addicionen llots de depuradora per simular un tractament en biopila.

Per comprovar la activitat del fong, tant en el procés de producció de biomassa com en la colonització de llots, s'analitza la producció del enzim lacasa.

Resultats

Les proves realitzades es divideixen en dos fases diferents:

- La primera fase es basa en la producció de *Trametes versicolor* en un reactor de tanc agitat en discontinu i la quantificació de la biomassa produïda.
- En la segona fase s'analitza la viabilitat de la biomassa produïda i la capacitat de colonització del fong en llots de depuradora utilitzant dos substrats diferents com a material de suport.

Producció de biomassa

Es realitzen diversos experiments, en la taula 1 es mostren els resultats de dos d'ells considerats representatius. Durant la realització del projecte es mesura la biomassa produïda en el bioreactor i també l'enzim lacasa.

Taula 1. Biomassa i activitat enzimàtica produïda en els dos reactors

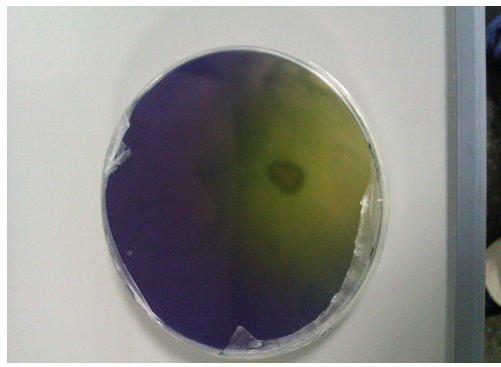
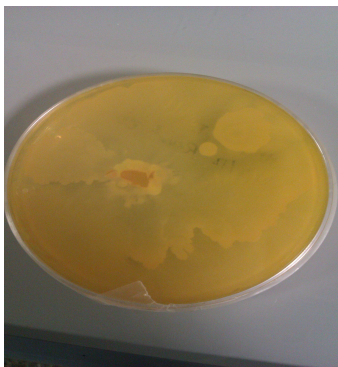
	Reactor 1	Reactor 2
Biomassa (pes sec)	6, 05 g/l	7,01 g/l
Activitat lacasa	193.2 U/l	51.2 U/l

Viabilitat del fong produït amb colorant

Els colorants utilitzats han estat Gris Lanaset G, Orange G i Methylene Blue. A la imatge 1 es mostren les plaques recent inoculades amb *Trametes versicolor* provinent del reactor 2.



imatge 1 Inoculació de *T.versicolor* produït en el bioreactor 2 (temps 0). D'esquerra a dreta: Orange G, Methilene Blue i Gris Lanaset G



Imatge 2. Creixement de *Trametes versicolor* al cap de 28 dies de ser inoculat a les plaques

En la imatge 2 es pot observar com al cap de 28 dies el fong ja ocupa la totalitat de la placa d'Orange G i més de la meitat de la placa de Methilene Blue. En canvi el creixement en la placa de Gris Lanaset és bastant pobre. Per altra banda també es pot veure la decoloració produïda per *T.versicolor* en Orange G i Methilene Blue.

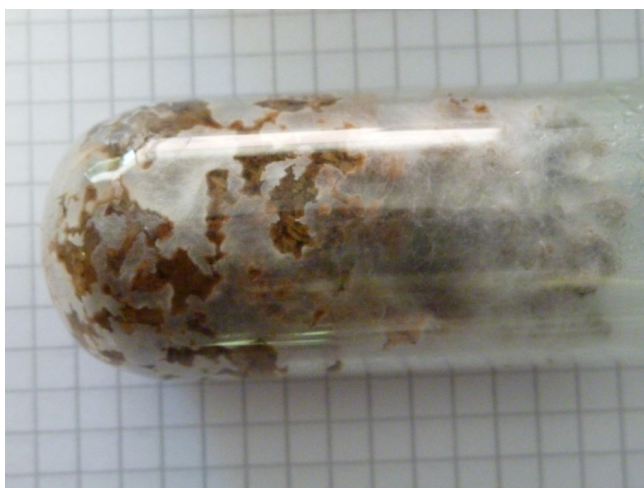
A més de l'observació visual de creixement i decoloració també s'ha mesurat el diàmetre de creixement del fong sobre la placa. Els resultats obtinguts es presenten a la taula 2.

Taula 2. Creixement de *T.versicolor* en les plaques amb colorant.

dia	Orange creixement <i>T.versicolor</i> (cm)	G de Methilene Blue creixement <i>T.versicolor</i> (cm)	Gris Lanaset G creixement <i>T.versicolor</i> (cm)
24/01/12	0	0	0
27/01/12	3,5	1,5	2
30/01/12	6,5	3	3
09/02/12	9	4	3
22/02/12	9	7	5,5

Proves de viabilitat en llots de depuradora

La biomassa obtinguda del bioreactor s'ha inoculat en dos substrats lignocel·lulòsics, branques d'olivera i pinso per a conills. Per comprovar la colonització dels substrats s'ha observat el creixement del fong i s'ha mesurat l'enzim lacasa per verificar que el fong és actiu.



Imatge 3. Pinso per a conills colonitzat per *T.versicolor*



Imatge 4. Branques d'olivera triturades colonitzades per *T.versicolor*

En la imatge 3 i 4 es mostra la colonització del pinso per a conills i de les branques d'olivera triturades per part del fong després de 10 dies d'incubació a 25°C. Com es pot observar el fong creix en el substrat i es procedeix a la addició dels llots de depuradora. Tal com es mostra la imatge 5, s'observa la barreja de llots d'EDAR i pinso per a conills colonitzat després de 15 dies, simulant un tractament en biopila.



Imatge 5. Llots de depuradora colonitzats per *T.versicolor*

Conclusions

S'ha aconseguit produir biomassa del fong *Trametes Versicolor* en un reactor de tanc agitat partint d'un cultiu en placa. També s'ha comprovat la viabilitat de la biomassa produïda en el bioreactor per dos vies diferents, donant en els dos casos resultats satisfactoris.