

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 11-160567- -6	FECHA: 2014-05-08 10:46:24
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 1 REGISTRO/DEPOSITO/CONCESION/DEPOSITO
TRA: 2 PATENTES DE INVENCION	FOLIOS: 7
ACT: 519 PRESENTACION	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

Asunto: Radicación: 11-160567- -6
 Trámite: 2
 Evento: 1
 Actuación: 519
 Oficio: 5444
 Folios: 7

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional	X				
Vía PCT (Fase Nacional)		Capítulo I		Capítulo II	
No. Solicitud Internacional					
Fecha de Presentación Internacional					

Como resultado del examen de fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado 11-160567-00000-0000	23/Noviembre/2011
Reivindicaciones:	Radicado 11-160567-00000-0000	23/Noviembre/2011
	Radicado 11-160567-00005-0000	21/Abril/2014
Dibujos:	Radicado 11-160567-00000-0000	23/Noviembre/2011

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del capítulo primero del Título 10 de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por la solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las

cubiertas por la tasa pagada. En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones 1 a 30 del capítulo reivindicatorio (Radicado N°. 11-160567-00005-0000).

Título de la solicitud: “Medio de Cultivo Indefinido Funcional con Inductor Natural de Biocompuestos”.

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de obtener medios naturales que incluyan inductores naturales no tóxicos de alta trazabilidad para la optimización en la producción de biocompuestos.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un medio de cultivo indefinido funcional con inductor natural de biocompuestos que comprende biomasa vegetal que incorpora alto contenido de cobre, vitaminas y minerales en traza y un inductor natural, que es vinagre vegetal.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K 36/07 // 36/74 // 65/00 // 38/47

4. De la solicitud de patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La reivindicación 1 carece de claridad y concisión porque:

Define el medio de cultivo en función del vinagre únicamente, ya que la biomasa vegetal tampoco está definida sino que se toma en sentido general caracterizada por la incorporación de oligoelementos en traza (Cu y minerales) y de vitaminas sin indicar cuáles.

Los términos “*al menos 50 micromoles de cobre y vitaminas y minerales en traza*” son relativos por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por un término o rango concreto.

El término: “mezcla” de las reivindicaciones 5 – 7, es impreciso, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por un término preciso o un rango concreto.

De acuerdo a la materia divulgada en la descripción, la diferencia entre el medio convencional y lo que la solicitante reclama es el hecho de que el inductor natural refinado evita la suplementación cuando transcurre el tiempo, en este orden de ideas, el elemento diferenciador debe incluirse de forma concreta desde la reivindicación independiente 1 y no solo en términos generales, ya que finalmente lo único fijo dentro del medio es el inductor de crecimiento.

En el folio 32 de la memoria descriptiva se indica que una modalidad preferida de la invención comprende un inductor natural que es un vinagre vegetal obtenido por un proceso de pirólisis, reposo y destilación fraccionada hasta conseguir un vinagre refinado grado farmacéutico. El vinagre corresponde entonces en estricto sentido a un extracto complejo de compuestos fenólicos, polifenoles, ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas cíclicas y otros hidrocarburos aromáticos¹, para que esto pueda ser patentable la solicitante tiene que definir la composición del extracto (vinagre) que proviene de una planta como el *Bambusoideae* y tener en cuenta que realmente es la composición aplicada como inductor de crecimiento la que origina el efecto técnico en el medio. El extracto se debe caracterizar entonces por la composición del mismo, compuestos activos y proporciones, definir el compuesto marcador e inclusive la huella cromatográfica del compuesto marcador.

1 Ou, M., Li, Z., Zhou, X., and Xu, X., Analysis on bamboo vinegar produced in Fujian. Peop. Rep. China, 31, 360– 363 (2003).

La reivindicación caracteriza un producto por un resultado a alcanzar como lo es la estabilidad grado farmacéutico de un vinagre vegetal leñoso, dicha estabilidad no es una característica técnica del inductor natural y está relacionada con el proceso de obtención de una solución y con el uso del medio de cultivo.

Las reivindicaciones 13 – 16 no establecen las proporciones de cada uno de los excipientes divulgados dentro de la composición. Se sugiere incluir estas características esenciales en las reivindicaciones.

Las reivindicaciones 21 - 26 no son concisas porque repiten materia.

La reivindicación 27 es muy amplia, lo cual dificulta determinar la extensión del objeto que se busca proteger.

La reivindicación 29 debe definir un proceso de fermentación por la secuencia lógica de etapas y condiciones físicas, químicas y microbiológicas y microorganismos involucrados y no por referencia al medio. Los elementos característicos del medio no son los mismos que los del proceso, además el proceso no está debidamente sustentado en la descripción.

La reivindicación 30 no es clara, debido a que define el producto obtenido en la fermentación por vía de un proceso que no está caracterizado. El producto se define por su estructura y no por la secuencia lógica para su obtención.

Descripción (Art 28 D 486)

La solicitud carece de información que permita comparar el medio de la presente invención con el medio sintético suplementado con inductores descrito en los ejemplos. De otra parte, la solicitud no revela las proporciones de cobre adicional suplementado en el medio de cultivo de la presente invención, lo cual dificulta determinar las concentraciones finales de este elemento dentro de la composición, esta carencia de información no permite validar los ejemplos aportados por el solicitante que comparan el medio reclamado con un medio sintético suplementado con inductores conocido previamente en el estado del arte, ni evidenciar un efecto potencializador de la producción de metabolitos secundarios obtenidos con dichos medios. En estos términos la descripción no es clara porque la información que contiene no permite que la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda comprender la solución aportada por la invención o pueda reproducirla o ejecutarla.

5. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de patente nacional: noviembre 23 de 2011, se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D3	Preussler et al.	“Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca <i>Trametes villosa</i> (sw.: Fr.) Kreisel”	2010
D4	Chen et al.	“Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar on nitrogen conservation and heavy metals immobility during pig manure composting”	8/Enero/2010

El documento D3² divulga la capacidad oxidativa de colorantes en medio sólido de *T. villosa* (ensayos de decoloración) y en el efecto del CuSO4 como inductor sobre la capacidad de secreción enzimática y la expresión génica de lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755 en medio líquido (Resumen).

El documento D4³ divulga los efectos del carbón de bambú (BC) y el vinagre de bambú (BV) añadidos a pilas de compostaje para la conservación de nitrógeno y la inmovilidad de Cu y Zn en el tratamiento de residuos orgánicos como el estiércol de cerdo (PM) (Resumen).

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel inventivo (Art 18 D486)

La reivindicación 1 consiste en: *“Un medio de cultivo indefinido funcional con inductor natural de biocompuestos que comprende:*

- a. Biomasa vegetal que incorpora al menos 50 micromoles de cobre y vitaminas y minerales en traza;*
- b. Inductor natural que es un vinagre vegetal leñoso estable grado farmacéutico” (Radicado N°. 11-160567-00005-0000).*

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D3	D4
Medio de cultivo indefinido funcional con inductor natural de biocompuestos	Medio de cultivo liquido (Pág. 2, Col. 1)	Inductor natural de compostaje (Resumen, Pág. 1178)
Biomasa vegetal que incorpora al menos 50 micromoles de cobre y vitaminas y minerales en traza	Compuesto por 12,7 g/L de extracto de malta, 0,5% de concentrado soluble de maíz y agua destilada, suplementado con 1 mM de CuSO4 (Pág. 2, Col. 1, Resumen, Pág. 4, Col. 2)	No se menciona
Inductor natural que es un vinagre vegetal leñoso	No se menciona	Inductor natural que es un vinagre de bambú (Resumen, Pág. 1178)

El documento D3 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga la composición de un medio líquido que comprende: 12,7 g/L de extracto de malta, 0,5% de concentrado soluble de maíz y agua destilada, los ensayos de actividad enzimática para lacasa confirmaron que *T. villosa* produce lacasa de manera extracelular con un máximo de 81 U/L a los 10 días de cultivo sin estimulación en medio líquido malta glucosado, al suplementar el medio con 1 mM de CuSO4 se produjo un incremento de la actividad enzimática, alcanzando valores 10 veces superiores en comparación con el obtenido en condiciones sin inductor a iguales tiempos de cultivo (Figura 2), otros hongos también muestran inducción de la actividad lacasa en presencia de cobre (Pág. 2, Col. 1, Resumen, Pág. 4, Col. 2)

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el medio divulgado de D3 consiste en que la solicitud se refiere a un inductor natural que es un vinagre vegetal leñoso.

El efecto que logra el incluir el inductor natural que es un vinagre vegetal leñoso es que evita la suplementación posterior del medio de cultivo de minerales y vitaminas.

2 Rev. Cienc. Tecnol. / Año 12 / N° 12a / 2010

3 Chemosphere 78 (2010) 1177–1181

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: cómo obtener un medio de cultivo alternativo para la optimización de la producción de biocompuestos.

Sin embargo, la utilización de vinagre vegetal leñoso para evitar la suplementación posterior del medio de cultivo, ya está divulgada en el documento D4 que se refiere al vinagre de bambú (VB) obtenido por un proceso de pirólisis, que contiene más de 200 tipos de componentes químicos en el que el ácido acético es el componente principal, utilizado para el tratamiento de residuos orgánicos como el estiércol de cerdo en la conservación de nitrógeno y la inmovilidad de Cu y Zn, así como regulador del crecimiento vegetal y activador de microorganismos (Resumen, Pág. 1178). Existe evidencia de que la persona del oficio normalmente versada en la materia se vería motivada a suplementar un medio de cultivo tanto con cobre como residuos ligninocelulósicos obtenidos a partir de un concentrado de maíz divulgados en el documento D3, debido a su efecto inductor sobre la producción extracelular de enzimas que se encuentran en la biomasa de varias especies de hongos, y con un inductor natural tal como un vinagre de bambú basado en las enseñanzas del documento D4 para aumentar la biodisponibilidad de Cu y Zn y así evitar la suplementación posterior del medio de cultivo de minerales y vitaminas.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría el inductor natural de vinagre de bambú del documento D4 en el medio divulgado en el documento D3 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Conclusión:

La reivindicación 1 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 – 28 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

7. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D3	Preussler et al.	1 – 28	Nivel inventivo
D4	Chen et al.	1 – 28	Nivel inventivo

8. Respuesta a los argumentos de la solicitante

En respuesta al requerimiento realizado por esta Superintendencia, la sociedad solicitante argumenta que los términos, ingredientes, rangos, proporciones y definiciones incluidas en las reivindicaciones corresponden con la amplitud propia del concepto inventivo desarrollado, sin embargo, se ha reemplazado el capítulo reivindicatorio de tal manera que las nuevas reivindicaciones 1-30 sean aún más claras y concisas.

Al respecto, teniendo en cuenta las modificaciones realizadas por la solicitante al pliego reivindicatorio y a la terminología utilizada, esta Superintendencia presenta los documentos D3 y D4 que anticipan el objeto de la presente solicitud como se evidenció en el análisis de patentabilidad por lo cual la materia reclamada en el nuevo pliego reivindicatorio carece de nivel inventivo.

Argumenta la solicitante que el medio de cultivo indefinido funcional que se define en las reivindicaciones aumenta la producción de variedad de biocompuestos, que pueden

ser metabolitos primarios o secundarios y que este importante aporte no se encuentra anticipado en el estado de la técnica.

Con relación al anterior argumento, este Despacho aclara que la solicitud carece de información que permita establecer un efecto inesperado o sorprendente del medio reclamado constituido por las actividades esenciales de proveer biocompuestos de interés, teniendo en cuenta que dichos inductores naturales se encuentran previamente divulgados en los documentos D3 y D4, por lo tanto, es de esperarse que los medios de cultivo de dichas anterioridades permitan igualmente optimizar la producción de biocompuestos que indica la solicitante.

Para efectos del examen, los términos relativos a aspectos no técnicos, tales como resultados alcanzados no se consideran como características técnicas de la invención, dado que no son características esenciales y restan claridad a la reivindicación. Se reitera a la solicitante que las reivindicaciones deben definir la invención por sus características técnicas esenciales y estructurales y por lo tanto, esta Superintendencia no admite que la reivindicación defina la invención por el resultado a alcanzar puesto que en realidad equivaldría a definir el problema técnico a resolver y el alcance de la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por la solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir del día siguiente de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2014-05-13

Elaboró: Sindy Johana Brochero Ballesteros
Revisó: Consuelo Leguizamon Leguizamon

Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisel

César A. Preussler, Ernesto Shimizu; Laura L. Villalba; Pedro D. Zapata.

Copper laccase induction in white rot fungi *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) Kreisel

ABSTRACT

White rot fungi hold great interest for biotechnological applications being at the same time able to produce extracellular enzymes like laccase. Laccase is a phenoloxidase with molecular weight between 60 and 80 kDa, with gene inducible expression probably reflecting the different physiological functions of the enzyme. The present work was focused on the dye oxidizing capacity of *T. villosa* BAFC 2755 in solid media (discoloration tests) and the effect of CuSO_4 as inductor on the enzyme secretion capacity and genetic expression in liquid media.

Discoloration tests in solid media showed good degrading capacity against bromophenol blue, malachite green and black liquor at low pH. Enzyme activity tests from liquid media confirmed extracellular laccase production induced with CuSO_4 . Total secreted proteins showed a significant increase in the presence of CuSO_4 . SDS-PAGE showed an increase in the protein fraction between 60 and 70 kDa. mRNA levels showed a clear increase in the presence of the inducer.

The results showed that the Cu_2^+ produced an increase on laccase activity in *Trametes villosa*. This rise could be due to an increase in the protein and mRNA

KEY WORDS: white rot fungi, *Trametes villosa*, laccase, enzyme induction, copper.

RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca presentan interés en aplicaciones biotecnológicas y son capaces de producir enzimas extracelulares como lacasa. La lacasa es una fenoloxidasas, con peso molecular entre 60 y 80 kDa, cuya expresión génica puede ser inducible, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de esta enzima. Este trabajo se enfoca en la capacidad oxidativa de colorantes en medio sólido de *T. villosa* (ensayos de decoloración) y en el efecto del CuSO_4 como inductor sobre la capacidad de secreción enzimática y la expresión génica de lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755 en medio líquido.

Los ensayos de decoloración en medio sólido mostraron una excelente capacidad degradativa frente a azul de bromofenol, verde de malaquita y licor negro a pH ácido. Los ensayos de actividad enzimática confirmaron la producción de lacasa extracelular inducible con CuSO_4 . Las proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de CuSO_4 , observándose en SDS-PAGE un aumento de la fracción proteica entre 60 y 70 kDa. Los niveles de mRNA mostraron un claro incremento en presencia del inductor.

Estos resultados demuestran que el Cu^{2+} produce un incremento de la actividad lacasa en *Trametes villosa*, y que este aumento podría deberse a un aumento en la cantidad de proteína y mRNA.

PALABRAS CLAVE: Hongos de pudrición blanca, *Trametes villosa*, lacasa, inducción enzimática, cobre.

INTRODUCCIÓN

La contaminación es la introducción en un medio cualquiera de una sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial. [1].

Recientemente han surgido aplicaciones biotecnológicas con potencial aplicación contra las fuentes de contaminación de una manera ecoeficiente, e incluyen el uso de bacterias u hongos, a menudo en combinación con procesos fisicoquímicos [2–6].

Los hongos son reconocidos por sus aptitudes superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares,

ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad para adaptarse a medios ambientes severos, sin restricciones [7]. Más allá de la producción de tales metabolitos, los hongos han llamado la atención con creciente interés por el biotratamiento (eliminación o destrucción) de ingredientes de aguas contaminadas tales como metales, nutrientes inorgánicos y componentes orgánicos [8–11].

La lignina, un polímero heterogéneo de los tejidos vasculares de las plantas superiores, es el más recalcitrante de todos los químicos orgánicos producidos naturalmente [12, 13]. Cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, inespecíficas. Los hongos degradadores de

lignina son buenos productores de estas enzimas y pueden ser clasificados dentro de tres categorías basadas en el tipo de descomposición de la madera que producen: hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición marrón y hongos de pudrición blanda [14].

Los hongos de pudrición blanca son los que presentan el principal interés para ser usados en varios procesos utilizando lignocelulosa, pero la mayoría degradan también a la celulosa y a la hemicelulosa [15–17]. Esta propiedad está basada en la capacidad de producir enzimas extracelulares con baja especificidad de sustrato capaces de degradar un amplio rango de componentes xenobióticos [18]. Las enzimas más importantes son lacasa (Lac), manganoso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) [15].

Algunos de los hongos de pudrición blanca producen todas estas enzimas, mientras que otros hongos producen únicamente algunas de ellas [15].

La lacasa es una fenoloxidasas, enzima que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua [19]. A través de la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina [20]. Contienen átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias [21]. La actividad de estas enzimas puede ser incrementada por el uso de mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]), e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico [22–23], así como iones metálicos como Mn^{+2} para la enzima MnP y Cu^{+2} para la enzima Lac [21].

Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, de los cuales entre el 15 al 20% de su peso molecular está dado por carbohidratos [24]. La lacasa fúngica (bencendiol-oxígeno oxidorreductasa) es una fenoloxidasas extracelular producida por el micelio de los hongos ligninolíticos [25].

La utilización de sistemas lacasa-mediador es una alternativa promisorio para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel [25], la decoloración de colorantes textiles [26] y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos [27, 28].

La regulación de la expresión de genes de la lacasa difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes de lacasa en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, mientras que en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno, fuentes de carbono o presencia de oligoelementos. [29–35].

El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto del cobre como inductor en la producción de la enzima Lacasa del hongo *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) Kreisel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En este estudio se utilizó el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* BAFC 2755 proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular (previamente cedidos gentilmente por el Departamento de Micología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires).

Preparación de los tacos

Para la preparación de tacos se utilizaron cultivos primarios en medio agar/extracto de malta (MEA), en placas de Petri de 100 mm de diámetro, las cuales fueron inoculadas por punción con ansa aguja en el centro de la placa, con el microorganismo en estudio. Se dejó incubar durante 5–7 días a 29 ± 1 °C en estufa. Este tiempo fue suficiente para obtener la colonia destinada a la generación de tacos para la siembra de todos los experimentos.

Los tacos de agar con micelio se extrajeron a partir de los márgenes de la colonia en crecimiento con la ayuda de un sacabocados de metal, de forma cuadrangular de 36 mm² de diámetro. Los tacos obtenidos de este modo fueron utilizados para la inoculación de los medios de cultivo sólidos así como también para los medios de cultivo líquidos.

Medios de cultivo sólido

Los medios de cultivo sólidos utilizados para los ensayos fueron agar malta glucosado (AMG: extracto de malta 12,7 g/L; agar 20 g/L y glucosa 10 g/L) y agar licor negro glucosado (LN: agar 20 g/L; glucosa 10 g/L; licor negro 6,7 % v/v; pH 11 y pH 4,7). El licor negro fue obtenido en la planta piloto de la FCEQyN (UNaM) a partir de la cocción kraft de maderas de eucalipto. Los colorantes utilizados para los ensayos en los medios sólidos fueron el verde de malaquita y el azul de bromofenol a 50 µM. [36, 37]

Los ensayos en medio de cultivo líquido se llevaron a cabo en erlenmeyers de 250 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 50 mL de medio compuesto por 12,7 g/L de extracto de malta, 0,5% de concentrado soluble de maíz y agua destilada. Estos medios fueron inoculados e incubados a 29 ± 1 °C en estufa de manera estática durante un período de tiempo comprendido entre 5, 7, 10 y 14

días, en todos los casos por duplicado. En cada uno de los días antes mencionados se procedió a la separación del micelio del medio de cultivo líquido por medio de filtración mediante Büchner, con filtros de fibra de vidrio (GF/C) previamente secados en estufa a 80 °C durante 30 minutos, en cada filtración se utilizaron 5 mL de agua destilada para enjuagar. Los sobrenadantes fueron congelados y posteriormente utilizados para la determinación de la actividad enzimática. Los micelios resultantes de la filtración fueron congelados para luego proceder a la extracción de ADN de los mismos.

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática para lacasa se realizó a partir de los sobrenadantes congelados obtenidos por filtración. La determinación se basó en el cambio de absorbancia del sustrato DMP (2,6-dimetoxifenol) adicionado a cada muestra, evidenciado mediante la utilización de un espectrofotómetro 8500 II Techcomp siguiendo técnicas descritas por Mouse *et al* [38]. La actividad enzimática se expresa en Unidades Internacionales (UI): $\mu\text{moles/min} \times \text{mL}$. Una UI es equivalente a 1 μmol de producto formado o sustrato degradado, por minuto.

Medición de proteínas totales

Para la medición de las proteínas totales de las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Electroforesis en poliacrilamida

Las proteínas procedentes de los filtrados fueron separadas por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) a 150 V por 45 min en geles con una concentración del 10 % en poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean 3D de Biorad. Los resultados se visualizaron mediante tinción con plata y se registraron mediante Scanner HP Deskjet F300 All-in-One series.

Extracción de ADN

Para proceder a la extracción del DNA se utilizaron los micelios congelados que fueron obtenidos anteriormente por medio del filtrado de los medios líquidos. Estos micelios fueron trozados y macerados con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. Luego se procedió a la digestión durante 45 a 60 minutos a 65° C en buffer conteniendo TrisHCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, SDS 1 %, CTAB 1 % y proteinasa K 0,1 mg /mL. Se purificó con

cloroformo–isoamílico 24:1 y acetato de potasio 3 M frío, para posteriormente precipitarlo con isopropanol y etanol al 70 %. Luego de redisolverlo en agua destilada estéril, se lo conservó a –20° C hasta el momento de su utilización.

Para corroborar la calidad, el material genético fue evaluado mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Aislamiento de RNA total

Para el aislamiento de RNA total el micelio filtrado se lavó 2 veces con Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M en frío y posteriormente se digirió 20 min con buffer de lisis (GuSNC 4 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M Tritón X 100 1 %) disgregando el micelio con varilla estéril en frío. Posteriormente se purificó con fenol saturado en TE y cloroformo. Las proteínas se precipitaron con acetato de potasio 3 M y el RNA fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol absoluto, secado y resuspendido en agua estéril libre de RNasas. Para corroborar la calidad del RNA aislado se realizaron geles de agarosa al 0,8 %.

RT

La retrotranscripción se realizó en un volumen de 20 μL utilizando 1 μL de Oligo (dT), dNTP's 5 mM, 40u/ μL de RNasin y 1000 U de la enzima MMLV (Fermentas SRL) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 42 °C. Todas las muestras fueron previamente digeridas con RQ1 DNAsa 1 μL por μg de RNA.

Amplificación de un fragmento génico por medio de la técnica PCR

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) se utilizaron 10 pmoles de cada cebador (sentido y antisentido), 10 mM de dNTPs, 1,5 mM de Cl_2Mg y 1 U de Taq Polimerasa en buffer al 1 x, además de agua deionizada para llevar a volumen de reacción deseado. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente: un ciclo a 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 56 °C y 72 °C respectivamente, y finalmente 2 min a 72 °C como paso de finalización de la reacción. Los resultados de la amplificación fueron corroborados por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 2 % utilizando una cuba electroforética (Sub System 70 de Labnet International Inc.), teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y fotografiados con cámara digital marca ACER.

Los cebadores utilizados en esta técnica fueron los publicados por D'Souza *et al.*, 1996, para las lacasas de otros basidiomicetes [39]:

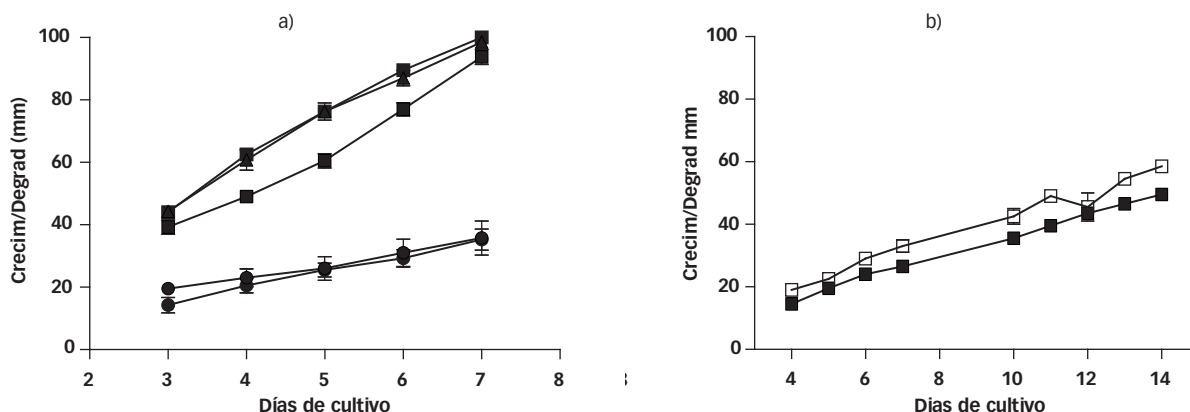


FIGURA 1: Referencias: a) Curva de crecimiento-decoloración en medio agar malta glucosado, (■) decoloración en presencia de azul de bromofenol, (□) crecimiento en presencia de azul de bromofenol, (●) decoloración en presencia de verde de malaquita, (○) crecimiento en presencia de verde de malaquita, (▲) crecimiento en ausencia de colorantes. b) Curva de crecimiento (■) y decoloración (□) en medio sólido con licor negro a pH ácido. En todos los casos las mediciones fueron tomadas entre los días 3 y 14. Se grafica el promedio de dos experimentos similares realizados por duplicado.

LacA – sentido 5' – CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA

LacA – antisentido 5' – RTGRCTRTGRTACCARAANGT

Las bandas amplificadas con los cebadores degenerados fueron purificadas, secuenciadas y analizadas mediante el programa BLASTn.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para verificar la capacidad oxidativa del hongo *Trametes villosa*, se realizaron primeramente ensayos de decoloración en medio sólido. Estos experimentos mostraron una excelente capacidad degradativa de *Trametes villosa* frente a azul de bromofenol, verde de malaquita (Figura 1 A) y licor negro a pH ácido (Figura 1 B).

El crecimiento en presencia de azul de bromofenol fue similar al del control sin colorante, mientras que en el caso del verde de malaquita se observó una notable inhibición del crecimiento respecto al control desde el 3° día de crecimiento ($p < 0,001$). Sin embargo, solo el azul de bromofenol permitió distinguir diferencias significativas entre crecimiento y degradación a los primeros días de cultivo ($p < 0,01$), desapareciendo estas diferencias al 7° día, probablemente debido a la confluencia de placa.

En el ensayo realizado con el efluente licor negro tanto el crecimiento como la degradación mostraron diferencias significativas respecto al control ($p < 0,1$).

Estos resultados son comparables a los mencionados en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación

utilizando otras especies de hongos de pudrición blanca, *Ganoderma applanatum* [36] y *Peniophora* spp [37] como así también en trabajos llevados a cabo por Haglund *et al.*, 2002 [40].

Los resultados de decoloración en medio sólido conteniendo licor negro solo mostraron decoloración en condiciones ácidas indicando que el pH es uno de los parámetros a considerarse en el escalado al aplicar este hongo a desechos industriales.

Los ensayos de actividad enzimática para lacasa confirmaron que *T. villosa* produce lacasa de manera extracelular con un máximo de 81 U/L a los 10 días de cultivo sin estimulación en medio líquido malta glucosado. Al suplementar el medio con 1 mM de CuSO_4 se produjo un incremento de la actividad enzimática, alcanzando valores 10 veces superiores en comparación con el obtenido en condiciones sin inductor a iguales tiempos de cultivo (Figura 2).

Otros hongos también muestran inducción de la actividad lacasa en presencia de cobre. Mouso *et al.*, 2003 [38], observaron un incremento de la actividad lacasa en el hongo de pudrición blanca *Stereum hirsutum*, utilizando CuSO_4 . Otros resultados concordantes en cuanto al aumento de la actividad enzimática de lacasa también han sido descriptos por Haglund *et al.*, 2002 [40], con el hongo

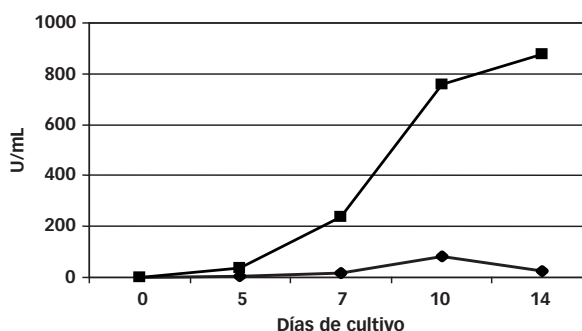


FIGURA 2: Niveles de actividad enzimática de Lacasa en función del tiempo en presencia (■) y ausencia (●) del 1 mM de CuSO_4 .

Trametes trogii. En contraposición a nuestros resultados, trabajos llevados a cabo por Gómez Dorado *et al.*, 2005 [41], no han podido correlacionar el efecto del CuSO_4 como inductor de la actividad enzimática de lacasa en el hongo *Trametes versicolor*, atribuyendo dicha observación a la naturaleza del efuente utilizado en su trabajo además de la presencia de otras enzimas con actividad oxidativa como manganoso peroxidasa (MnP).

Existe evidencia de la presencia de promotores sensibles a metales en genes de enzimas ligninolíticas [31, 33]. Sin embargo, los metales también pueden actuar estabilizando el mensajero o activando el procesamiento, tráfico y plegamiento proteico [42]. Algunos trabajos sugieren la presencia de isoenzimas de lacasa de respuesta diferencial ante iones metálicos. Yaver *et al.*, 1995, han reportado dos isoenzimas correspondientes a lacasa, de unos 63 kDa, una de expresión constitutiva y la otra de expresión inducible [33]; mientras que Han *et al.*, 2005, en *Trametes versicolor*, solo han podido aislar una lacasa constitutiva de un tamaño aproximado a los 97 kDa [43].

Para determinar el comportamiento de los hongos estudiados, se evaluó el efecto del agregado de CuSO_4 sobre las proteínas secretadas y sobre el mRNA.

Los niveles de proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de CuSO_4 (Figura 3A). Al visualizarse este incremento en geles de SDS-PAGE se observa un aumento de la fracción proteica comprendida entre 60 kDa y 70 kDa aproximadamente, rango de peso dentro del cual se encuentran las isoenzimas de lacasa publicadas en la literatura (Figura 3 B).

Para evaluar los niveles de mRNA producidos se utilizaron cebadores degenerados para lacasa y se ajustaron las condiciones de la RT-PCR utilizando diferentes cantidades de RNA total de partida de modo que permita diferenciar un cambio de expresión del mensajero buscado. Para verificar si el producto de amplificación correspondía efectivamente a un fragmento del gen de lacasa se aisló DNA, se ampli-

ficó, secuenció y analizó mediante el programa BLASTn, comprobándose una homología del 80 % con la secuencia génica L49376 publicada para lacasa de *Trametes villosa* (clon LCC1).

Secuencia obtenida:

**TCGTGACCAGTGCCCGATCTCGCTCGGGNA-
ATTCGTTTCCTGTCACAATTTCCCGGTTTCCT-
GACCAGGCNNGTAAGNGCGCCTCGTA**

El análisis de los productos de amplificación obtenidos partiendo de DNA y RNA mediante el uso de estos cebadores degenerados también permitió visualizar el intrón de 50 pb publicado por Yaver *et al.*, 1995 (datos no mostrados). [33].

Una vez comprobada la identidad del amplicón hallado, para la técnica de RT-PCR se utilizaron las muestras de RNA total extraídas correspondientes a los días 5, 7, 10 y 14 de cultivo con y sin tratamiento con CuSO_4 1mM visualizándose un claro incremento en la producción de mensajeros ante la presencia del inductor desde el día 5, e intensificándose a días posteriores de cultivo. (Figura 4)

CONCLUSIONES

Los ensayos de decoloración en medio sólido demostraron ser un método eficiente para develar la capacidad degradativa del hongo estudiado.

Los ensayos de actividad enzimática confirmaron que el hongo *Trametes villosa* BAFC 2755 produce una enzima lacasa extracelular inducible con CuSO_4 . Las proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de CuSO_4 , observándose en SDS-PAGE un aumento de la fracción proteica entre 60 y 70 kDa. Los niveles de mRNA mostraron un claro incremento en presencia del inductor.

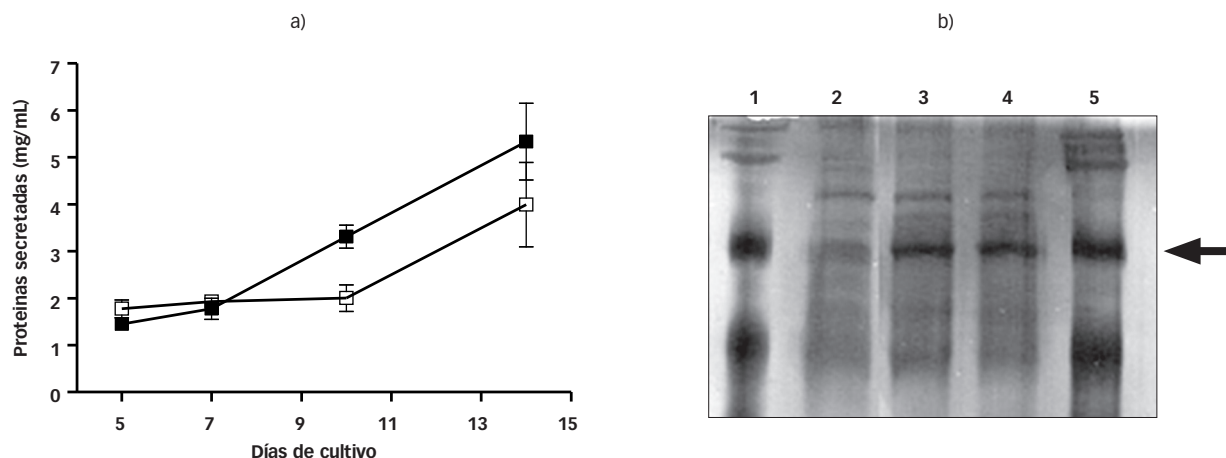


FIGURA 3: Referencias: a) proteínas totales en función del tiempo en presencia (■) y ausencia (□) de 1 mM de CuSO_4 ; b) SDS-PAGE. Carril 1 y 5: marcador de peso molecular; carril 2 sin CuSO_4 ; carril 3 y 4 con 1 mM de CuSO_4 . La flecha indica la banda correspondiente a 78 kDa aproximadamente. En todos los carriles se colocaron 20 μg de proteínas.

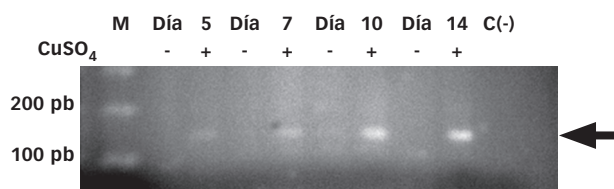


FIGURA 4: RT-PCR para un fragmento del gen lacasa. Las reacciones fueron llevadas a cabo con 3 ug de RNA total de partida aislado de cultivos de 5, 7, 10 ó 14 días con (+) o sin (-) tratamiento de 1 mM de CuSO₄. Referencias: M: marcador de peso molecular, C(-): control negativo (sin RNA). La flecha indica el amplicón de 150 pb esperado.

Estos resultados promisorios son un punto de partida para iniciar estudios que contemplen las aplicaciones de producción de la enzima lacasa a partir de hongos de pudrición blanca utilizando el cobre como inductor de su producción.

BIBLIOGRAFÍA

- NEVEL B., WRIGTH R. Ciencias Ambientales. Banco Mundial. *La Contaminación Ambiental en la Argentina: Temas y Opciones para su Gestión*. Editorial Prentice Hall, 1999.
- MCMULLAN G., MEEHAN C., CONNELLY A., KIRBY N., ROBINSON T., NIGAM P., ET AL. *Mini-review: microbial decolorisation and degradation of textile dyes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: p81–87, 2001.
- ROBINSON T., MCMULLAN R., NIGAM P. *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative*. Bioresour Technol 77: p247–255, 2001.
- BORCHERT M., LIBRA J.A. *Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus Trametes versicolor in sequencing batch reactors*. Biotechnol. Bioeng. 75: p. 313–321, 2001.
- BEYDILLI M.I., PAVLOSTATHIS S.G., TINCHER W.C. *Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions*. Water Sci. Technol.; 38: p. 225–232, 1998.
- ZISSI U., LYBERATOS G. *Partial degradation of p-aminobenzene by a defined mixed culture of Bacillus subtilis and Stenotrophomonas maltophilia*. Biotechnol. Bioeng. 72: p. 49–54, 2001.
- BOOMINATHAN K., REDDY C.A. *Fungal degradation of lignin: biotechnological applications*. In. Handbook of applied mycology. Vol. 4, p. 763–822. Ed. Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G. Marcel Dekker, New York, 1992.
- MURUGESAN K. *Bioremediation of paper and pulp mill effluents*. Indian J. Exp. Biol. 41: p. 1239–48, 2003.
- MACHADO K.M.G., MATHEUS D.R., BONONI B.L.R. *Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi*. Braz. J. Microbiol. 36: p. 246–252, 2005.
- PALMA C., MOREIRA M.T., MIELGO I., FEIJOO G., LEMA J.M. *Use of a fungal bioreactor as a post treatment step for con-*

tinuous decolorisation of dyes. Wat. Sci. Technol. 40: p. 131–136, 1999.

- COULIBALY L., NAVEAU H., AGATHOS S.N. *A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecule-laden wastewater pretreatment under sewer conditions by Aspergillus niger*. Wat. Res. 36: p. 3941–3948, 2002.
- HÜTTERMANN A., MAI C., KHARAZIPOUR A. *Modification of lignin for the production of new compounded materials*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 387–94, 2001.
- ERIKSSON K.E., BLANCHETTE R.A., ANDER P. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer. Berlín. New York, p. 20, 1990.
- LEONOWICZ A., MATUSZEWSKA A., LUTEREK J., ZIEGENHAGEN D., WOJTAŚ WASILEWSKA M., CHO N.S., HOFRICHTER M., ROGALSKI J. *Biodegradation of lignin by white rot fungi*. Fungal Genet. Biol. 27: p. 175–85, 1999.
- WESENBERG D., KYRIAKIDES I., AGATHOS N.S. *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. Biotechnol. Adv. 22: p. 161, 2003.
- MARTÍNEZ A.T., SPERANZA M., RUIZ DUEÑAS F.J., FERREIRA P., CAMARERO S., GUILLÉN F., MARTÍNEZ M.J., GUTIÉRREZ A., DEL RÍO J.C. *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin*. Int. Microbiol. 8: p. 195–204, 2005.
- SHAH V., NERUD F. *Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization*. Can. J. Microbiol. 48: p. 857–870, 2002.
- LUND M., RAGAUSKAS A.J. *Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 699–703, 2001.
- GIANFREDA L., XU F., BOLLAG J.M. *Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes*. Biorem. J. 3: p. 1–25, 1999.
- CAMBRIA M.T., MINNITI Z., LIBRANDO V., CAMBRIA A. *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Rigidoporus lignosus and its laccase in the presence of redox mediators*. Appl. Biochem. Biotechnol. 149: p. 1–8, 2008.
- GALHAUP C., HALTRICH D. *Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: p. 225–232, 2001.
- HAN M.J., CHOI H.T., SONG H.G. *Degradation of phenanthrene by Trametes versicolor and its laccase*. J. Microbiol. 42: p. 94–98, 2004.
- MAJCHERCZYK A., JOHANNES C., HÜTTERMANN A. *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: p. 267–276, 1999.
- LEONOWICZ A., CHO N.S., LUTEREK J., WILKOLAZKA A., WOJTAŚ WASILEWSKA M., MATUSZEWSKA A., HOFRICHTER M., WESENBERG D., ROGALSKI J. *Fungal laccase: properties and activity on lignin*. J. Basic. Microbiol. 41: p. 185–227, 2001.
- MAYER A.M., STAPLES R.C. *Laccase: new functions for an old enzyme*. Phytochemistry 60: p. 551–65, 2002.

26. REYES P., PICKARD M.A., VAZQUEZ DUHALT R. *Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase*. Biotechnol. Lett. 21: p. 875–880, 1999.
27. RODRÍGUEZ E., PICKARD M.A., VAZQUEZ DUHALT R. *Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi*. Curr. Microbiol. 38: p. 27–32, 1999.
28. BOHMER S., MESSNER K., SREBOTNIK E. *Oxidation of phenantrene by fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: p. 233–238, 1998.
29. BALDRIAN P. *Fungal laccases – occurrence and properties*. FEMS Microbiol. Rev. 30: p. 215–242, 2005.
30. VANDERTOL VANIER H.A., VAZQUEZ DUHALT R., TINOCO R., PICKARD M.A. *Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of Coriolopsis gallica laccase*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29: p. 214–220, 2002.
31. ZHENG Z., OBBARD J.P. *Regulation of laccase gene transcription in Trametes versicolor*. Enzyme Microb. Technol. 31, p. 3–9, 2002.
32. MANSUR M., SUÁREZ T., GONZÁLEZ A.E. *Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197)*. Appl. Environ. Microbiol. 64: p. 771–774, 1998.
33. YAVER D.S., XU F., GOLIGHTLY E.J., BROWN K.M., BROWN S.H., REY M.W., SCHNEIDER P., HALKIER T., MONDORF K., DALBOGE H. *Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete Trametes villosa*. Appl Environ Microbiol 62: 834–841, 1996.
34. SMITH M., SHNYREVA A., WOOD D.A., THURSTON C.F. *Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes lcc1 and lcc2 in the cultivated mushroom Agaricus bisporus*. Microbiology 144: p. 1063–1069, 1998.
35. WOLFAARDT F., TALJAARD J.L., JACOBS A., MALE J.R., RABIE C.J. *Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips*. Bios Technol 95: p25–30, 2004.
36. SHIMIZU E. *Biodegradación de contaminantes de la industria papelera por el hongo Ganoderma applanatum*. Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, 2006.
37. VELEZ RUEDA J.O. *Caracterización bioquímica de la enzima lacasa de la cepa Peniophora sp. BAFC 633 para su potencial aplicación en procesos de biorremediación*. Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, 2007.
38. MOUSO N., PAPINUTTI L., FORCHIASSIN F. *Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por Stereum hirsutum (Willd) Pers*. Rev. Iberoam. Micol. 20: p. 176–178, 2003.
39. D'SOUZA T.M., BOOMINATHAN K., REDDY C.A. *Isolation of lacasse gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR*. Appl. Environ. Microbiol. 62: p. 3739–3744, 1996.
40. HAGLUND C., LEVÍN L., FORCHIASSIN F., LÓPEZ M., VIALE A. *Degradation of environmental pollutants by Trametes trogii*. Rev. Argent. Microbiol. 34: p. 157–62, 2002.
41. GÓMEZ DORADO C., MARTÍNEZ SALGADO M., NIETO MOSQUERA D., PEDROSA RODRÍGUEZ A., RODRÍGUEZ VÁZQUEZ R., ROSAS ACOSTA J. *Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-Peroxidasa y Lacasa producidas por Trametes versicolor y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera*. UNIVERSITAS SCIENTARIUM. Revista de la Facultad de Ciencias 10: p. 37–45, 2005.
42. LODISH, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, BALTIMORE, DARNELL. *Biología Celular y Molecular 4ª edición*. Editorial Panamericana. Buenos Aires, 2001.
43. HAN M.J., CHOI H.T., SONG H.G. *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor*. J. Microbiol. 43: p. 555–60, 2005.

Recibido: 13/02/08,
Aprobado: 17/07/09

- Cesar Adrian Preussler.
Licenciado en Genética graduado en la Universidad Nacional de Misiones. Es becario del CEDIT. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.
- Ernesto Shimizu.
Licenciado en Genética graduado en la Universidad Nacional de Misiones. Es ex-becario del CEDIT y de la FCEQyN. Actualmente realiza estudios de doctorado mediante una beca. Agencia en el INTA EEA Balcarce. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.
- Pedro Darío Zapata.
Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, en el programa Biomedicina. Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee actualmente la Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. Se desempeña además como Director y Co-Director de proyectos Incentivados y Subsidiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.
- Laura L. Villalba.
PhD de la State University of New York, College of Environmental Science and Forestry. Profesor adjunto de los cursos Pulpados Químicos y Operaciones Fundamentales en la fabri-

cación de la Pulpa y el Papel (Maestría en Ciencias de la Madera, Pulpa y Papel), Cátedras de Coloquio I, II, Organización Industrial y relaciones laborales (Tecnicatura Universitaria en Celulosa y Papel), Transferencia de masa (Ingeniería en Alimentos), Operaciones de Transferencia de masa (Ingeniería Química). Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. Se desempeña además como

Directora y Co-Directora de proyectos Incentivados y Subsidios por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL), Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Posadas, Misiones, Argentina. Av. Mariano Moreno 1375 (3300). bcmb@fceqyn.unam.edu.ar.



Technical Note

Effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar on nitrogen conservation and heavy metals immobility during pig manure composting

Ying-Xu Chen^{a,b,*}, Xiang-Dong Huang^b, Zhi-Ying Han^{a,b}, Xiao Huang^b, Bin Hu^b, De-Zhi Shi^{a,b}, Wei-Xiang Wu^{a,b,1}^a Zhejiang Province Key Laboratory for Water Pollution Control and Environmental Safety, Hangzhou 310029, PR China^b Institute of Environmental Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, PR China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2009

Received in revised form 10 December 2009

Accepted 13 December 2009

Available online 8 January 2010

Keywords:

Compost

Addition

Nitrogen loss

Cu

Zn

Immobilization

ABSTRACT

Composting is an effective methodology for the treatment of organic waste like pig manure (PM) before land application. However, nitrogen loss through NH_3 volatilization during the thermophilic phase is one of the major disadvantages of composting. The presence of Cu and Zn in compost arising from pig feed additives is also an issue. In this study the effects of bamboo charcoal (BC) and bamboo vinegar (BV) added to composting piles on nitrogen conservation and immobility of Cu and Zn during PM composting was investigated. Total Kjeldahl nitrogen (TKN) loss and mobility of Cu and Zn decreased with increased BC addition. TKN loss and mobility of Cu and Zn in the treatment with 9% BC at the end of composting significantly decreased by 65%, 35% and 39% respectively, as compared to the control. Addition of BV further decreased TKN loss. After composting, TKN loss in the treatment with 3% BC + 0.4% BV was 23% lower than that in the treatment with 9% BC. The final results indicated that by adding BC or BC + BV into PM composting is an effective method to reduce TKN loss and control the mobility of Cu and Zn.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The production of pig manure (PM) is of an enormous magnitude in China, but its overproduction has led to inappropriate disposal practices when it is used as an organic fertilizer. This fact involves negative effects for agricultural soils, including eutrophication of waterways, excessive input of heavy metals (HMs), inorganic salts, pathogens and foul odor (Zhou et al., 2005; Gómez-Brandón et al., 2008).

The environmental problems associated with the management of manures have given rise to the need for environmentally sound and economically feasible technologies for treating PM before application to agricultural soils. Composting is one of the best-known processes to solve these environmental problems by transforming manures into a safer and more stabilized material for application to soil (Bustamante et al., 2008; Moral et al., 2009). Composting involves the accelerated degradation of organic matter by microorganisms under controlled conditions, in which the or-

ganic material undergoes a characteristic thermophilic phase that allows sanitization of the waste by the elimination of pathogenic microorganisms (Lazcano et al., 2008). However, the loss of nitrogen through volatilization of NH_3 during the thermophilic phase of the process is one of the major disadvantages (Pagans et al., 2006). This fact worsens the quality of compost products, and leads to important economic losses and some environmental problems, i.e. acid rain and eutrophication (Sommer and Hutchings, 2001). On the other hand, Cu and Zn are widely applied as additives to pig feed by pig raisers for shortening the duration of breeding, resulting in high concentrations of Cu and Zn in PM (Cang et al., 2004; Zhou et al., 2005). Consequently, land application of PM may cause adverse effects on human health through the food chain (Guerra-Rodríguez et al., 2006).

Among all practicable methods for nitrogen loss control and HM immobilization during composting, the use of amendments is thought to be the most effective way to reduce nitrogen loss and immobilize HMs. Amendment materials, such as alum, peat and zeolite are proven effective to control NH_3 volatilization (Kithome et al., 1999; Lefcourt and Meisinger, 2001). Furthermore, lime and coal ash are proven to have effects on immobility of HMs in composting mixtures (Wong et al., 1997; Wong and Selvam, 2006). Nevertheless, non-renewable, potentially negative influences on soil pH are factors that have prevented these amendments from being adopted widely in composting technology. Therefore, it is necessary to find some renewable and safe amendments which

* Corresponding author. Address: Zhejiang Province Key Laboratory for Water Pollution Control and Environmental Safety, Hangzhou 310029, PR China. Tel.: +86 571 86971159; fax: +86 571 86971411.

E-mail addresses: yxchen@zju.edu.cn (Y.-X. Chen), huangxiangdong78@yahoo.cn (X.-D. Huang).

¹ These authors contributed equally to this work.

can both conserve nitrogen and immobilize HM during PM composting.

Bamboo is a renewable bioresource when the cycle of its plantation and use is properly managed. Pyrolyzing bamboo under oxygen-limited conditions produces bamboo charcoal (BC). BC has a large amount of micropores and an extremely large surface area, about 4 and 10 times greater than those in wood charcoal, respectively (Zhao et al., 2008). Bamboo vinegar (BV) is a brown-red transparent liquid produced during pyrolysis of BC and contains more than 200 types of chemical components, in which acetic acid is the main component (Mu et al., 2004). Recently, BC has been used as an excellent adsorbent for removal of environmental pollutants such as NO_3^- , NH_4^+ , Pb^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} from water (Mizuta et al., 2004; Asada et al., 2006; Wang et al., 2008). BV has also attracted great attention recently. Wang and Chen (2002) reported that BV could be used as a soil disinfectant, compost fermenting agent, plant growth regulator, and microorganism activator.

However, there has been little information on the potential effects of BC or BC mixed with BV on nitrogen conservation and HM immobilization during PM composting. The objectives of this study were therefore to evaluate the potential effects of both materials on nitrogen conservation and HM immobilization during PM composting.

2. Materials and methods

2.1. Composting materials

PM and sawdust (SW) were collected from a pig farm and a sawmill located in Xiaoshan District, Hangzhou, China. The purpose of using SW was to adjust the C/N ratio and water content of the composting pile. Matured PM compost (MPMC) was purchased from a composting plant located in Xiaoshan District, and used as an inoculum to shorten the composting cycle. BC and BV were purchased from the Yaoshi Charcoal-Production Company located in Hangzhou. The selected physicochemical characteristics of the experimental materials are shown in Table 1.

2.2. Composting experiments

There were seven different treatments in the experiment, which were named as follows: control, 3% BC, 6% BC, 9% BC, 3% BC + 0.2% BV, 3% BC + 0.4% BV, and 3% BC + 0.6% BV, respectively. Each treatment had three replications that were carried out in three identical bins. The dimensions of each bin were $1.0 \times 0.4 \times 1.0$ m. The stock material of each treatment was prepared as below (all in fresh weight).

Control: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC;
3% BC: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC + 3% BC (w/w);

6% BC: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC + 6% BC (w/w);
9% BC: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC + 9% BC (w/w);
3% BC + 0.2% BV: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC + 3% BC + 0.2% BV (w/w);
3% BC + 0.4% BV: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC + 3% BC + 0.4% BV (w/w);
3% BC + 0.6% BV: 100 kg PM + 7 kg SW + 7 kg MPMC + 3% BC + 0.6% BV (w/w).

Moisture content of the stock material was initially adjusted to about 65%. No further adjustment in moisture was made throughout the composting period.

2.3. Composting sampling

At the day 0, 7, 14, 21, 28, 35, 49, and 56, from each bin, three subsamples were taken at three randomized points of the entire profiles and mixed to comprise one representative sample. Thus, each treatment has three representative samples from three bins. Representative sample from each bin was divided into two parts. One part was immediately stored at 4 °C till analysis, the other part was air-dried, passed through a 0.25 mm sieve and stored in desiccator for further analysis. Temperatures at different locations within the piles, including the surface (20 cm to top), center, and bottom (20 cm from bottom) were measured by thermometer three times a day and the obtained values were then averaged. Ambient temperature was also monitored at the same time. Aeration was ensured by pushing fresh air actively (0.13 L h^{-1}) through a perforated tube at the bottom of each bin during the first 4 weeks of composting, and by manually turning the pile over every 7 d afterwards.

2.4. Analytical methods

Germination index (GI) and pH were measured by aqueous compost extracts obtained from fresh samples. The aqueous compost extracts were obtained by mechanically shaking the samples with double distilled water at a solid:water ratio of 1:10 (w/v, dry weight basis) for 1 h (Huang et al., 2004). The pH value was measured using a pH meter. Cress seeds (*Lepidium sativum* L.) were used for GI measurement using Eq. (1) (Zucconi et al., 1981).

$$\text{GI} (\%) = 100 \frac{G_t L_t}{G_c L_c} \quad (1)$$

G_t : germination of treatment (%); L_t : root length of treatment; G_c : germination of control (%); L_c : root length of control.

Total Kjeldahl nitrogen (TKN), ash, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) extractable Cu and Zn and total Cu and Zn were monitored in air-dried samples. TKN was measured by the Kjeldahl digestion method (Bremner, 1996). Ash was determined after com-

Table 1
Selected physicochemical characteristics of raw materials (dry weight basis).

Parameter	PM	SW	MPMC	BC	BV
pH	7.24–7.45	4.47–4.49	8.47–8.68	8.82–8.86	2.36–2.58
EC (mS cm^{-1})	5.45	0.03	5.18	–	3.59
Water content (%)	70.1	15.1	35.7	11.0	–
Total Kjeldahl nitrogen (%)	2.90	0.14	2.09	–	–
C/N	12.9	410	16.3	–	–
Total Cu (mg kg^{-1})	623	8.98	555	0.38	0.13
Total Zn (mg kg^{-1})	1631	6.36	888	0.35	1.94
Pyrolysis temperature (°C)	–	–	–	600	–
Bulk density (g cm^{-3})	–	–	–	0.40	–
Specific surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	–	–	–	359	–

PM: pig manure; SW: sawdust; MPMC: matured pig manure compost; BC: bamboo charcoal; BV: bamboo vinegar; EC: electrical conductivity.
–, Not analyzed.

bustion in an oven at 550 °C for 8 h (Zhu, 2007). The TKN loss was calculated using Eq. (2) (Paredes et al., 2000).

$$N_{\text{Loss}} (\%) = 100 - 100 \frac{X_1 N_2}{X_2 N_1} \quad (2)$$

X_1 , N_1 : initial ash content and TKN concentration; X_2 , N_2 : ash content and TKN concentration at any particular sampling time during composting.

Extraction efficiency of DTPA extractable Cu and Zn was calculated using Eq. (3).

$$\text{Extraction efficiency } (\%) = 100 \frac{C_{\text{DTPA-HM}}}{C_{\text{Total-HM}}} \quad (3)$$

$C_{\text{DTPA-HM}}$: concentration of DTPA extractable HM; $C_{\text{Total-HM}}$: concentration of total HM.

The extraction efficiency difference of DTPA extractable HM was calculated by subtracting the extraction efficiency at any particular sampling time from the initial extraction efficiency during composting. For total Cu and Zn determination, 0.5 g dried and ground samples were digested with mixture of nitric, hydrochloric, and hydrofluoric acid in the ratio of 1:1:2 (Ščančar et al., 2000). DTPA extractable Cu and Zn were determined by mechanically shaking the same samples at a 1:5 solid to extractant ratio (w/v) for 2 h with a solution containing 0.05 M DTPA, 0.01 M CaCl₂, and 0.1 M triethanolamine at pH 7.3 (Lindsay and Norvell, 1978). Cu and Zn in the resulting solution were determined by flame atomic absorption spectrophotometer (Thermo Element MKII-6).

3. Results and discussion

3.1. Variation of temperature during composting

As shown in Fig. 1a, the composting pile temperature went through three typical phases (heating, thermophilic, and cooling phase) and ranged from 30 °C to 66 °C during the entire period of composting. However, the BC treatments affected the temperatures during the different composting phases. It took only 1 d for treatments with high additions of BC (6% and 9%) to reach 50 °C and enter the thermophilic phase, indicating quick establishment of microbial activity in the composting pile. The 3% BC treatment needed 3 d to reach 50 °C. For BC + BV treatments, 2 d were needed to reach 50 °C. However, the control treatment required 4 d, a comparative longer time, to reach 50 °C. On the other hand, pile temperature of the control decreased faster than the others and entered the cooling phase at day 25. However, the other treatment did not enter the cooling phase till day 36. The addition of BC or BC + BV appeared to contribute to the quick temperature rise and the prolonged thermophilic phase during composting.

3.2. Variation of pH during composting

As shown in Fig. 1b, pH values of all treatments decreased during the 1st week, and then increased during the following time for about 3–5 weeks, and finally decreased again. The decrease in pH in the 1st week may result from the release of organic and inorganic acids during the degradation of organic matter (Mathur, 1991). The rise in pH may be related to the production and accumulation of ammonia, while the subsequent decrease in pH may be caused by ammonium volatilization (Roca-Pérez et al., 2009), nitrification (Sánchez-Monedero et al., 2001) or the production of low molecular organic acids (Mathur, 1991).

From the 7th d to the 35th d, pH of BC or BC + BV treatments were all lower than that of the control. This may be explained in that ammonia was adsorbed by BC, which inhibited dissolution

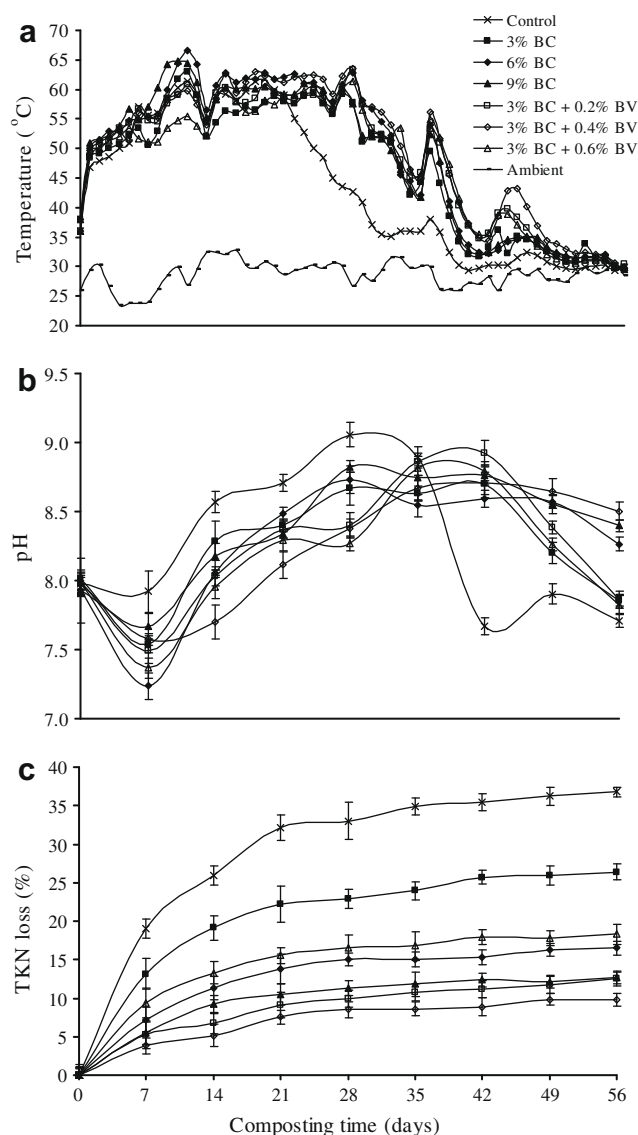


Fig. 1. Variation of temperature (a), pH (b), and TKN (total Kjeldahl nitrogen) loss (c) during composting.

into the compost solution to release OH[−] ion. Furthermore, addition of BV could neutralize OH[−] ion, which could also restrain pH from rising. These results indicated that addition of BC or BC + BV into composting material could decrease pH by 0.2–0.7 at the thermophilic phase. Bernal et al. (2009) mentioned that pH was a very relevant factor for controlling nitrogen loss by ammonia (pK_a = 9.25) volatilization, which could be particularly high at pH > 7.5. Higher pH at the thermophilic phase increases ammonia volatilization. Therefore, lower pH resulting from the addition of BC or BC + BV at the thermophilic phase may decrease nitrogen loss.

3.3. Variation of TKN loss during composting

TKN loss increased with composting time (Fig. 1c). However, TKN loss decreased with increased BC addition (Fig. 1c). TKN loss from the 3% BC, 6% BC and 9% BC treatments were reduced by 28%, 61% and 65%, respectively, compared to the control after composting. This means that addition of BC could significantly reduce TKN loss. Many studies have reported that both activated carbon and BC have the ability to adsorb ammonia gas due to their large specific surface area and quantities of micropores (Iyobe et al.,

2004; Asada et al., 2006). Thus, it is likely that the high adsorption capability of BC contributed to the considerable reduction of TKN loss during composting. Furthermore, as compared to the control, the lower pH value at the thermophilic phase caused by the addition of BC might also have contributed to the reduced TKN loss (Fig. 1a and c).

Addition of BC + BV also significantly decreased TKN loss. TKN loss from the 3% BC + 0.2% BV, 3% BC + 0.4% BV and 3% BC + 0.6% BV treatments was reduced by 66%, 74% and 50%, respectively, compared to the control after composting. Thus, the role of BV addition in controlling TKN loss during composting was even better than that increased BC alone. However, only the appropriate amount of BV addition could achieve the optimal control of TKN loss by the end of composting. The lowest TKN loss (10%) was observed in the 3% BC + 0.4% BV treatment, which was 23% lower than that (13%) in the 9% BC treatment. The reduced TKN loss by BV might result from the high content of various types of organic acids in BV (Mu et al., 2004), which would decrease ammonia emission loss by neutralizing ammonia directly or improving the adsorption capacity of BC for ammonia indirectly (Asada et al., 2006). Up to now, there has been no report on the combined role of BC and BV in nitrogen conservation during PM composting. Our results suggest that the combined addition of BC and BV could be an effective method to reduce TKN loss during PM composting.

3.4. Variation of DTPA extractable Cu and Zn extraction efficiency during composting

DTPA extractable content of HM can be used to estimate the mobility of HM in most cases (Hseu, 2006). In our study, extraction efficiency of DTPA extractable Cu and Zn of all treatments decreased with composting time (Fig. 2).

Extraction efficiency of DTPA extractable Cu and Zn also decreased with increasing amount of BC (Fig. 2). This means that the bioavailability of Cu and Zn was reduced with increasing amount of BC. Compared to the control, the extraction efficiency differences of DTPA extractable Cu in the 3% BC, 6% BC and 9% BC treatments increased by 6%, 29% and 35%, and that of Zn by 19%, 31% and 39%, respectively, after composting. The results indicated that addition of BC to the composting material could reduce the bioavailability of Cu and Zn. The immobility of Cu and Zn was attributed to the adsorption of Cu and Zn by BC. Wang et al. (2008) reported that BC had a high adsorption capacity for HM and attributed this adsorption to the large specific surface area, high surface density of functional groups and metal oxides of BC. In addition, similar to other carbonaceous materials, BC has a large quantity of surface negative charge and a high charge density (Liang et al., 2006), which can also improve the adsorbing capacity of BC for positively charged HM ions.

Addition of BC + BV also significantly decreased extraction efficiency of DTPA extractable Cu and Zn (Fig. 2). As compared to the control, the extraction efficiency differences of DTPA extractable Cu in the 3% BC + 0.2% BV, 3% BC + 0.4% BV, and 3% BC + 0.6% BV treatments increased by 11%, 14% and 11%, and that of Zn by 29%, 29% and 29%, respectively, after composting. The results suggest that BV played an important role in improving the immobilization of Cu and Zn. Wang et al. (2006) has reported that proper portion of BV could stimulate microbial activity during composting. Furthermore, humus produced during composting was reported to reduce the mobility of HM effectively through metal-humus complex formation (Canarutto et al., 1991). Thus, it can be speculated that the addition of BV stimulated microbial activity and humus formation during composting which resulted in enhanced HM immobility.

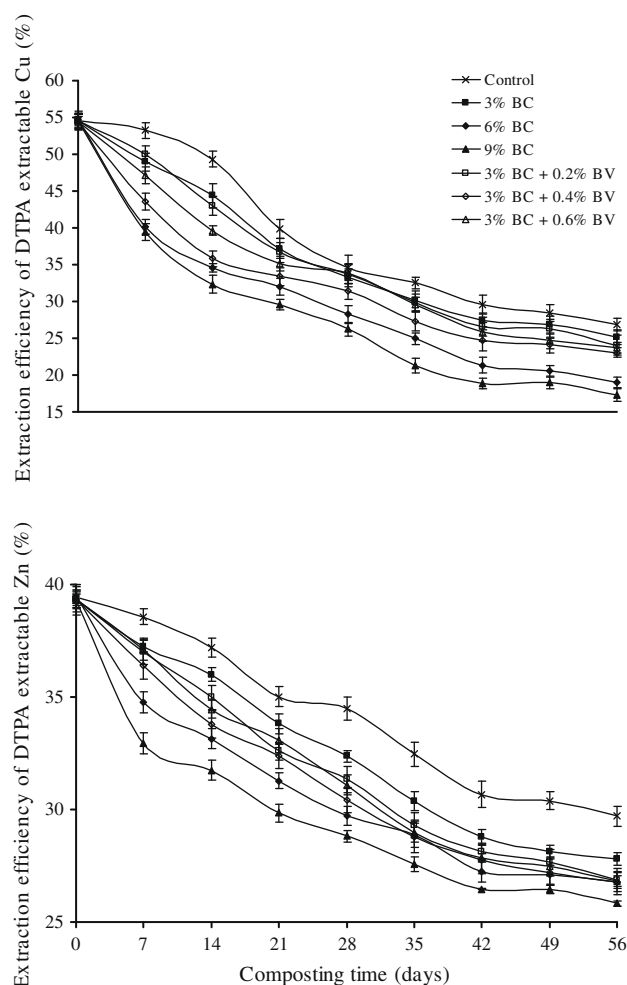


Fig. 2. Variation of DTPA extractable Cu and Zn extraction efficiency (concentration ratio of DTPA extractable heavy metal to total heavy metal) during composting.

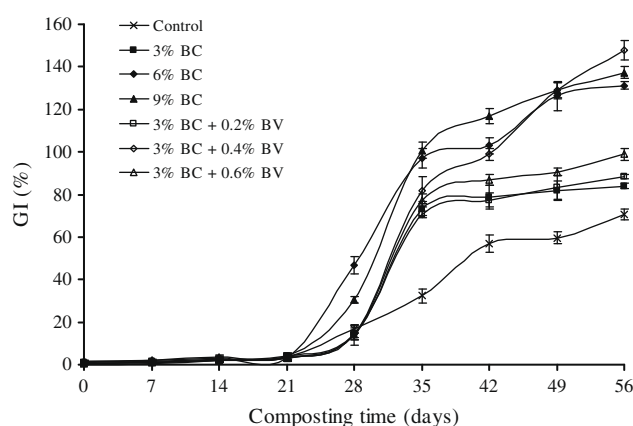


Fig. 3. GI (germination index) variation during composting.

3.5. Variation of germination index during composting

GI is an integrated biological indicator, regarded as the most sensitive parameter used to evaluate the toxicity and maturity of compost (Zucconi et al., 1981).

GI of all treatments was quite low during the first 3 weeks (Fig. 3). The result might be attributed to the release of toxic concentrations of ammonia and low molecular weight short chain

volatile fatty acids during the early phase of composting (Mathur, 1991). GI increased gradually from the 3rd week during composting (Fig. 3). As a GI of 50% has been used as an indicator of phytotoxin-free compost (Zucconi et al., 1981), the results in Fig. 3 indicated that the composts from all treatments except the control were matured enough by day 35.

GI of the treatments increased with increasing amount of BC in the composting material (Fig. 3). Addition of BC + BV could further increase the GI during composting (Fig. 3). GI of 3% BC, 6% BC and 9% BC treatments increased by 19%, 86% and 95%, respectively, compared to the control after composting. In contrast, the GI of treatments with 3% BC + 0.2% BV, 3% BC + 0.4% BV, and 3% BC + 0.6% BV increased by 25%, 109% and 40%, respectively. These results highlighted that the addition of BC could improve the GI of compost. Proper incorporation of BV could also be effective in raising the GI of PM composting materials.

4. Conclusions

The addition of BC or BC + BV into PM composting materials influenced temperature, pH and GI changes. It shortened the time needed to enter the thermophilic phase, decreased pH at the thermophilic phase, and increased GI of the composting material. The addition of BC or BC + BV reduced TKN loss and mobility of Cu and Zn in PM composting materials. TKN loss was reduced by 74% in the 3% BC + 0.4% BV treatment. The mobility of Cu and Zn was reduced by 35% and 39% in the 9% BC treatment. These results indicate that the addition of BC or BC + BV into PM composting materials is an effective method to reduce negative effects of PM composting.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Mia Schouten and two anonymous reviewers for their valuable comments and suggestion to the manuscript. The authors also thank Dr. Murray, B. McBride for the language improvement. This work was financially supported by National Key Science and Technology Project: Water Pollution Control and Treatment (No. 2008ZX0710-006) and National Natural Science Foundation of China (No. 40873059).

References

- Asada, T., Ohkubo, T., Kawata, K., Oikawa, K., 2006. Ammonia adsorption on bamboo charcoal with acid treatment. *J. Health Sci.* 52, 585–589.
- Bernal, M.P., Albuquerque, J.A., Moral, R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100, 5444–5453.
- Bremner, J.M., 1996. Nitrogen-total. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 3 – Chemical Methods*. SSSA Inc., Madison, WI, USA, pp. 1085–1121.
- Bustamante, M.A., Paredes, C., Marhuenda-Egea, F.C., Pérez-Espinosa, A., Bernal, M.P., Moral, R., 2008. Co-composting of distillery wastes with animal manures: carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. *Chemosphere* 72, 551–557.
- Canarutto, S., Petruzzelli, G., Lubrano, L., Guidi, G.V., 1991. How composting affects heavy-metal content. *Biocycle* 32, 48–50.
- Cang, L., Wang, Y.J., Zhou, D.M., Dong, Y.H., 2004. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu province, China. *J. Environ. Sci.* 16, 371–374.
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Domínguez, J., 2008. The evaluation of stability and maturity during the composting of cattle manure. *Chemosphere* 70, 436–444.
- Guerra-Rodríguez, E., Alonso, J., Melgar, M.J., Vázquez, M., 2006. Evaluation of heavy metal contents in co-composts of poultry manure with barley wastes or chestnut burr/leaf litter. *Chemosphere* 65, 1801–1805.
- Hseu, Z.Y., 2006. Extractability and bioavailability of zinc over time in three tropical soils incubated with biosolids. *Chemosphere* 63, 762–771.
- Huang, G.F., Wong, J.W.C., Wu, Q.T., Nagar, B.B., 2004. Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Manage.* 24, 805–813.
- Iyobe, T., Asada, T., Kawata, K., Oikawa, K., 2004. Comparison of removal efficiencies for ammonia and amine gases between woody charcoal and activated carbon. *J. Health Sci.* 50, 148–153.
- Kithome, M., Paul, J.W., Bomke, A.A., 1999. Reducing nitrogen losses during simulated composting of poultry manure using adsorbents or chemical amendments. *J. Environ. Qual.* 28, 194–201.
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., Domínguez, J., 2008. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere* 72, 1013–1019.
- Lefcourt, A.M., Meisinger, J.J., 2001. Effect of adding alum or zeolite to dairy slurry on ammonia volatilization and chemical composition. *J. Dairy Sci.* 84, 1814–1821.
- Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J.O., Thies, J., Luizão, F.J., Petersen, J., Neves, E.G., 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 1719–1730.
- Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421–428.
- Mathur, S.P., 1991. Composting processes. In: Martin, A.M. (Ed.), *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. Elsevier, New York, pp. 147–186.
- Mizuta, K., Matsumoto, T., Hatate, Y., Nishihara, K., Nakanishi, T., 2004. Removal of nitrate-nitrogen from drinking water using bamboo powder charcoal. *Bioresour. Technol.* 95, 255–257.
- Moral, R., Paredes, C., Bustamante, M.A., Marhuenda-Egea, F., Bernal, M.P., 2009. Utilization of manure composts by high-value crops: safety and environmental challenges. *Bioresour. Technol.* 100, 5454–5460.
- Mu, J., Uehara, T., Furuno, T., 2004. Effect of bamboo vinegar on regulation of germination and radicle growth of seed plants. II: composition of moso bamboo vinegar at different collection temperature and its effects. *J. Wood Sci.* 49, 262–270.
- Pagans, E., Barrena, R., Font, X., Sánchez, A., 2006. Ammonia emissions from the composting of different organic wastes. Dependency on process temperature. *Chemosphere* 62, 1534–1542.
- Paredes, C., Roig, A., Bernal, M.P., Sánchez-Monedero, M.A., Cegarra, J., 2000. Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fert. Soils* 32, 222–227.
- Roca-Pérez, L., Martínez, C., Marcilla, P., Boluda, R., 2009. Composting rice straw with sewage sludge and compost effects on the soil-plant system. *Chemosphere* 75, 781–787.
- Sánchez-Monedero, M.A., Roig, A., Paredes, C., Bernal, M.P., 2001. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. *Bioresour. Technol.* 78, 301–308.
- Ščančar, J., Milačič, R., Stražar, M., Burica, O., 2000. Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge. *Sci. Total Environ.* 250, 9–19.
- Sommer, S.G., Hutchings, N.J., 2001. Ammonia emission from field applied manure and its reduction-invited paper. *Eur. J. Agron.* 15, 1–15.
- Wang, D.Q., Zhao, M., Pan, S., 2006. Application of bamboo vinegar in composting. *Environ. Eng.* 24, 70–75 (in Chinese).
- Wang, S.Y., Tsai, M.H., Lo, S.F., Tsai, M.J., 2008. Effects of manufacturing conditions on the adsorption capacity of heavy metal ions by Makino bamboo charcoal. *Bioresour. Technol.* 99, 7027–7033.
- Wang, W.L., Chen, W.Z., 2002. The present situation of processing and utilization of bamboo charcoal in Zhejiang and the countermeasures. *J. Bamboo Res.* 21, 58–63 (in Chinese).
- Wong, J.W.C., Fang, M., Li, G.X., Wong, M.H., 1997. Feasibility of using coal ash residues as co-composting materials for sewage sludge. *Environ. Technol.* 18, 563–568.
- Wong, J.W.C., Selvam, A., 2006. Speciation of heavy metals during co-composting of sewage sludge with lime. *Chemosphere* 63, 980–986.
- Zhao, R.S., Yuan, J.P., Jiang, T., Shi, J.B., Cheng, C.G., 2008. Application of bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the determination of atrazine and simazine in environmental water samples by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detector. *Talanta* 76, 956–959.
- Zhou, D.M., Hao, X.Z., Wang, Y.J., Dong, Y.H., Cang, L., 2005. Copper and Zn uptake by radish and pakchoi as affected by application of livestock and poultry manures. *Chemosphere* 59, 167–175.
- Zhu, N.W., 2007. Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice straw. *Bioresour. Technol.* 98, 9–13.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54–57.