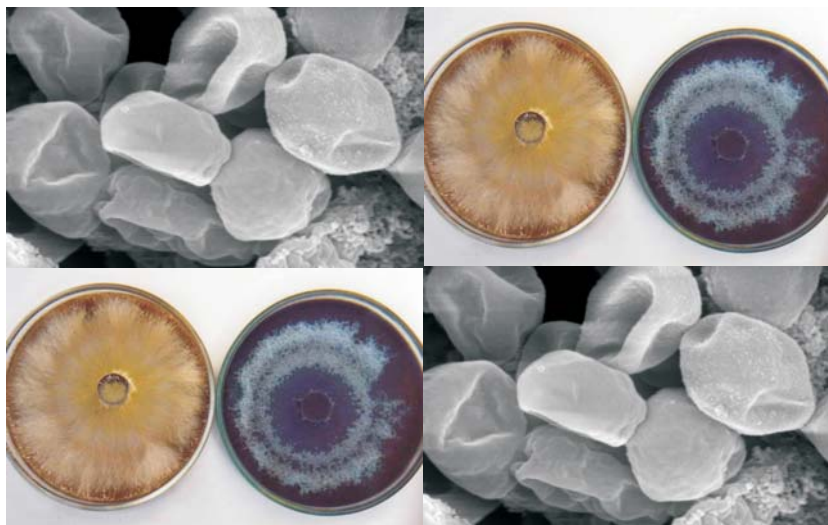


Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado



República Federativa do Brasil

Luis Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Hélio Tollini

Ernesto Paterniani

Luis Fernando Rigato Vasconcellos

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Meio Ambiente

Paulo Choji Kitamura

Chefe Geral

Geraldo Stachetti Rodrigues

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Cristina Martins Cruz

Chefe-Adjunto de Administração

Ariovaldo Luchiari Junior

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 1516-4675

Março, 2004

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 18

Produção de Enzimas Ligninolíticas por Fungos Isolados de Solos sob Cultivo de Arroz Irrigado

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva
Itamar Soares de Melo
Pablo Roberto Oliveira

Jaguariúna, SP
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - Km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 - Cep.13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750
Fax: (19) 3867-8740
www.cnpma.embrapa.br
sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Geraldo Stachetti Rodrigues
Secretário-Executivo: Maria Amélia de Toledo Leme
Secretário: Sandro Freitas Nunes
Membros: Marcelo A. Boechat Morandi, Maria Lúcia Saito, José
 Maria Guzman Ferraz, Manoel Dornelas de Souza, Heloisa
 Ferreira Filizola, Cláudio César de A. Buschinelli
Normalização bibliográfica: Maria Amélia de Toledo Leme
Foto(s) da capa: Itamar Soares de Melo
Editoração eletrônica: Alexandre Rita da Conceição

1ª edição

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Silva, Célia Maria Maganhotto de Souza.

Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado / Célia Maria M. de S. Silva, Itamar Soares de Melo, Pablo Roberto Oliveira. - Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2004.

18 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente, ISSN 1516-4675; 18)

1. Peroxidase. 2. Biodegradação. I. Melo, Itamar Soares de. II. Oliveira, Pablo Robreto. III. Série.

CDD 547.23

© Embrapa 2004

Sumário

Resumo	4
Abstracts	5
Introdução	6
Material e Métodos	7
Resultados e Discussão	9
Referências Bibliográficas	13

Produção de Enzimas Ligninolíticas por Fungos Isolados de Solos Sob Cultivo de Arroz Irrigado

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva¹

Itamar Soares de Melo²

Pablo Roberto Oliveira³

Resumo

A proposta deste trabalho foi estudar o potencial das linhagens fúngicas, consideradas potenciais degradadoras dos herbicidas quinclorac e propanil, isoladas tanto da cultura de arroz como em sedimentos de áreas produtoras de arroz irrigado, para produção de enzimas ligninolíticas. O complexo enzimático degradador da lignina é descrito como responsável pela degradação de vários poluentes orgânicos. Um método simples e rápido para a seleção de fungos com atividade ligninolítica é a utilização de corantes poliméricos. Assim, oito linhagens fúngicas foram cultivadas em meio de cultura líquido King's B suplementado com 0,05% de Remazol Brilliant Blue R (RBBR). As mesmas linhagens foram também cultivadas em meio de cultura líquido contendo farelo de trigo como substrato, para a determinação das atividades enzimáticas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases. Os resultados demonstraram padrões diferenciados quanto a produção de enzimas ligninolíticas entre as linhagens, sendo que as maiores atividades enzimáticas estiveram relacionadas à produção de lignina. O nível máximo detectado foi de 6,079U L⁻¹ (linhagem P11SA4F), seguida de 3,332U L⁻¹ (linhagem P2SA6F). Das oito linhagens apenas duas (P3SA1F e P11SA2F) apresentaram descoloração do RBBR, sugerindo a sua possível aplicabilidade em estudos de biodegradação e biorremediação em áreas contaminadas com propanil e quinclorac.

¹Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, Embrapa Meio Ambiente. celia@cnpma.embrapa.br

²Biólogo, Doutor em Fitopatologia, Embrapa Meio Ambiente. itamar@cnpma.embrapa.br

³Bolsista da FAPESP, modalidade treinamento técnico, Embrapa Meio Ambiente. pabloliveira@yahoo.com.br

Production of Ligninolytic Enzymes and Peroxidases by Fungi Isolated from Irrigated Rice

Abstract

The aim of this work was to study the potential of fungus strains considered as prospective degraders for the herbicides quinclorac and propanil, isolated from both cultivated rice and from sediments in irrigated rice production areas, for ligninolytic enzyme production. The enzymatic complex that degrades lignin has been described as being responsible for the degradation of several organic pollutants. A simple and quick method to select fungi with ligninolytic activity is the use of polymeric dyes. Thus, eight fungus strains were grown in King's B liquid culture medium supplemented with 0.05% Remazol Brilliant Blue R (RBBR). The same strains were also grown in liquid culture medium containing wheat bran as substrate, to determine the enzymatic activities of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccases. Results demonstrated differential patterns of ligninolytic enzyme production between strains; the highest enzymatic activities were related to the production of lignin. The maximum level detected was 6.079 U L^{-1} (P11SA4F strain), followed by 3.332 U L^{-1} (P2SA6F strain). From the eight strains, only two (P3SA1F and P11SA2F) showed RBBR discoloration, suggesting the possibility of their application in biodegradation and bioremediation studies in areas contaminated with propanil and quinclorac.

Introdução

O arroz irrigado é uma das culturas de maior importância econômica e social no sul do Brasil. No Estado de Santa Catarina, é cultivada em 130 mil hectares, com o envolvimento de aproximadamente 10 mil famílias de agricultores, em mais de 60 municípios. As áreas de produção concentram-se ao longo do litoral e em vales, cujas águas são utilizadas na irrigação do arroz, abastecimento das propriedades rurais e consumo urbano e industrial (Epagri, 2001).

A quase totalidade dos orizicultores, tem necessidade do uso de herbicidas para o controle das plantas daninhas. Estima-se que, anualmente, são aplicados mais de cinco milhões de litros de agrotóxicos nestas lavouras. Entre os herbicidas empregados estão o quinclorac e o propanil. É inevitável que a grande quantidade de princípios ativos utilizados tenha efeitos negativos sobre o ambiente. A biodegradação é uma alternativa viável para diminuição da concentração destes compostos no mesmo. No entanto, são raras as informações sobre a degradação da maioria dos agrotóxicos utilizados nas lavouras de arroz irrigado sob condições brasileiras.

Muitas enzimas responsáveis pela degradação de agrotóxicos são extracelulares. Por exemplo, o complexo enzimático degradador da lignina tem sido descrito como responsável pela degradação de vários poluentes orgânicos (Barr & Aust, 1994a;b; Pointing, 2001). Esta característica é uma vantagem no uso de fungos ligninolíticos na biorremediação. Este complexo consiste de lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases que podem ser definidas como fenoloxidasas. As enzimas lignina (LiP) e manganês peroxidase (MnP) pertencem a classe das peroxidases e oxidam seus substratos pela redução de um elétron com a formação de um radical catiônico. A MnP atua exclusivamente como fenoloxidase em substratos fenólicos utilizando Mn^{2+}/Mn^{3+} como par redox intermediário. As lacases são consideradas verdadeiras fenoloxidasas e oxidam fenóis e estruturas ligninolíticas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de radicais que podem repolimerizar ou levar a despolimerização (Higuchi, 1989). Alguns fungos, aparentemente, apresentam os dois tipos de exoenzimas (peroxidases e lacases) enquanto outros podem ter um ou o outro tipo (Tuor et al., 1995; Hofrichter, 2002) .

Um método simples e rápido para a seleção de fungos com atividade ligninolítica, é a utilização de corantes poliméricos, semelhantes ao polímero da lignina. Estes corantes são usados como substrato para o sistema degradador da lignina e também podem determinar o começo do metabolismo secundário nos fungos ligninolíticos (Pasti & Crawford, 1991). O corante mais utilizado devido a sua importância industrial é o Remazol Brilliant Blue R (RBBR), um derivado do antraceno que representa uma classe importante de poluentes orgânicos, freqüentemente tóxicos e persistentes. Este corante é estruturalmente semelhante a certos compostos aromáticos policíclicos que são substratos para as peroxidases ligninolíticas (Momohara et al., 1990; Reid & McDonald, 1991; Hammel, 1992). A descoloração do mesmo tem sido descrita por muitos autores como sendo atribuída, principalmente, devido à lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases (Pasti & Crawford, 1991; Vyas & Molitoris, 1995; Swamy & Ramsay, 1999; Moreira et al., 2001).

Considerando que o sedimento das áreas produtoras de arroz irrigado pode apresentar uma mistura de resíduos de agroquímicos e restos de cultura, a proposta deste trabalho foi estudar o potencial das linhagens fúngicas obtidas nestas áreas, bem como na própria cultura do arroz, consideradas potenciais degradadoras dos herbicidas propanil e quinclorac, para produção de enzimas ligninolíticas semelhantes à dos fungos da podridão branca.

Material e Métodos

Organismos e condições culturais: Oito linhagens fúngicas foram isoladas de solos agrícolas sob cultivo de arroz, com histórico de aplicações contínuas dos herbicidas propanil e quinclorac. O procedimento de isolamento consistiu em plaqueamento de diluições seriadas de solo, em meio de cultura Katayama modificado (K_2HPO_4 0,5g; $NaNO_3$ 0,5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0125g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,005g; Sol. traço 10mL; agar 13g; água destilada 1L; pH 7,0), suplementado com propanil ($10\mu g mL^{-1}$) e quinclorac ($10\mu g mL^{-1}$). Solução traço: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg; $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 3mg; H_3BO_3 30mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 20mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 1mg; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 2mg; $NaMoO_4 \cdot H_2O$ 3mg; água destilada 1L. As culturas foram incubadas a 28°C por quatorze dias. As linhagens que apresentaram crescimento vigoroso, consideradas potenciais degradadoras, foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Foram cultivadas durante 7 dias. Posterior-

mente, as oito linhagens selecionadas (Tabela 1) foram transferidas (3 discos com 9mm de diâmetro) para Erlenmeyers contendo meio de cultura líquido, de composição adequada, para as seguintes determinações analíticas: atividades enzimáticas e oxidação do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR).

Oxidação do corante RBBR: Oito linhagens fúngicas foram cultivadas em meio de cultura líquido King's B contendo proteose-peptona (10g); K_2HPO_4 (1,5g); $Mg.SO_4.7H_2O$ (1,5g); glicerina (12,45g) água destilada (1L), suplementado com 0,05% de Remazol Brilliant Blue R. Os frascos foram incubados a 30°C, no escuro, sob agitação constante (130rpm), durante o tempo apropriado para o crescimento dos fungos. A descoloração, que esteve associada à oxidação do corante, foi determinada pelo monitoramento do decréscimo do pico de absorvância a 595nm, usando espectrofotômetro UV-1601PC marca Shimadzu. O micélio gerado foi separado por filtração e pesado. A determinação da biomassa foi realizada por gravimetria, por meio de secagem em estufa à 70°C, até peso constante. Amostras sem os microrganismos foram utilizadas como testemunha. O experimento constou de três repetições.

Análises enzimáticas: as oito linhagens fúngicas selecionadas como potenciais degradadoras foram cultivadas em meio de cultura líquido (4,5g farelo de trigo; 1,5g extrato de levedura; 1g glicose; 0,5g cloreto de amônia; 100mL solução de sais; 900mL água destilada). Os cultivos foram incubados durante 7 dias a 30°C. A seguir foram filtrados e utilizados para determinação das atividades enzimáticas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases.

As atividades enzimáticas foram medidas diretamente em amostras do meio de cultivo. A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido ($\epsilon_{310}^{TM} = 9300M^{-1} cm^{-1}$) na oxidação do álcool veratrílico usado como substrato. A mistura reativa continha 375µL de tampão tartarato de sódio 0,33M pH 3,0; 125µL de álcool veratrílico 4mM; 50µL de peróxido de hidrogênio 10mM; 450µL de água destilada e 250µL de meio de cultivo, dando um volume final de 1250mL.

A manganês peroxidase foi medida a 610nm ($\epsilon_{610}^{TM} = 4460M^{-1} cm^{-1}$) utilizando a metodologia descrita por Kuwahara et al. (1984). A mistura reativa (1mL) continha meio de cultivo (500µL); vermelho de fenol (100µL); lactato de sódio 250mM (100µL); albumina bovina 0,5% (200µL); sulfato de manganês 2mM (50mL) e peróxido de hidrogênio 2mM (50mL) preparado em tampão succinato de sódio

20mM, pH 4,0. As reações ocorreram a 30°C, durante 5 minutos e foram interrompidas pela adição de NaOH 2N (40µL).

A atividade da lacase também foi medida espectrofotometricamente, como oxidação da o-dianisidina a 525nm ($\epsilon_{525}^M = 65,000M^{-1} cm^{-1}$). A mistura reativa continha em 1mL: tampão citrato-fosfato 0,5M pH 5,0 (200µL); solução 1mM de o-dianisidina (100µL), meio de cultivo (600µL) e peróxido de hidrogênio 1mM (100µL).

Todas as análises usaram meio de cultura fervido como controle. Para todas as enzimas uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1µmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína. Todos os valores apresentados foram médias de três repetições.

Resultados e Discussão

Duas enzimas oxidativas são responsáveis pela degradação da lignina: as peroxidases e lacases. Os diferentes fungos testados neste trabalho cresceram bem no meio de cultura líquido suplementado com farelo de trigo. Apesar disso, demonstraram padrões diferenciados quanto à produção de enzimas ligninolíticas (Tabela 1). As diferenças químicas e estruturais nas diversas fontes não-homogêneas da lignina levam à especialização dos respectivos microrganismos degradadores, principalmente quanto às enzimas oxidativas expressadas por cada um deles.

Tabela 1: Produção de enzimas ligninolíticas e descoloração do Remazol Brilliant Blue R (RBBR) por linhagens fúngicas isoladas em cultura de arroz irrigado.

Linhagens	Atividade enzimática (UL ¹)			Degradação remazol (%)	Biomassa (g)
	Lignina peroxidase	Mangans peroxidase	Lacase		
P2SA5F	ND*	0,192	0,699	6.0	0.90
P2SA3F	3,125	2,765	0,753	4.1	0.82
Q4SR1F	1,136	ND	0,056	25.0	0.83
P3SA1F	ND	ND	0,609	42.1	1.50
P11SA2F	ND	ND	0,299	47.2	0.98
P6SM2F	1,745	0,736	ND	8.2	0.82
P2SA6F	3,332	ND	0,530	1.3	1.13
P11SA4F	6,079	ND	ND	10.3	1.23
GASI3.4	18,851	1,084	6,057	54.1	1.11

*ND: Não detectado.

As maiores atividades enzimáticas detectadas estiveram relacionadas à produção de lignina peroxidase. O nível máximo detectado foi de 6.079U L⁻¹ (linhagem P11SA4F), seguida de 3,332U L⁻¹ (linhagem P11SA4F). Nenhum dos fungos testados pode ser comparado em produção de LiP ao *Ganoderma* sp linhagem GASI3.4 (18,851U L⁻¹), considerado controle neste estudo.

De acordo com Rothschild et al. (2002) a atividade da LiP tem sido relatada em alguns fungos da podridão branca enquanto as lacases são observadas para vários destes fungos. Uma vez que genes que codificam isoenzimas LiP são encontrados em fungos que não produzem LiP, Reddy (1993) e Dittmer et al. (1997) postularam que esta atividade é restringida pelo meio de cultivo. Já Rothschild et al. (1995) relataram que ao melhorar a disponibilidade de oxigênio no meio de cultura, *P. Chrysosporium* sintetizou LiP em condições consideradas não-ligninolíticas. A secreção desta enzima provavelmente resulta de modificações fisiológicas características de mudança do metabolismo primário para secundário sob diferentes condições fisiológicas e tipo de substrato (Boominathan et al., 1993; Reddy & D'Souza, 1994).

A atividade enzimática da MnP somente foi observada em três linhagens, sendo que apenas uma apresentou concentração mais alta (2,765U L⁻¹) do que a obtida com a linhagem controle (1,084U L⁻¹). As demais linhagens apresentaram atividade muito baixa ou ausente. A produção de MnP pela linhagem P2SA3F pode ser considerada como eficiente, principalmente se comparar esta atividade com as obtidas por Arora et al. (2002) com fungos da podridão branca. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a atividade da MnP foi máxima em *P. radiata* (29,8U mL⁻¹), sendo que este valor foi 15 vezes maior do que o encontrado em *P. chrysosporium*. A produção de MnP é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos, mas não é descartada a hipótese de que outros fungos possam produzi-la pois o seu excepcional potencial degradativo não está limitado à lignina. Na última década foram descritos como possíveis substratos para esta enzima derivados geo-bioquímicos da lignina e poluentes orgânicos entre os quais xenobióticos persistentes (Hofrichter, 2002).

Considerando a glicose como fonte de carbono (C) e farelo de trigo como indutor da atividade enzimática, foi encontrado para lacase, atividades variando de 0,056U L⁻¹ a 0,753U L⁻¹. A linhagem com produção mais alta de lacase foi a P2SA3F, seguida das P2SA5F (0,699U L⁻¹) e P3SA1F (0,609U L⁻¹). A linhagem

de *Ganoderma* sp apresentou atividade bem mais alta (6,057U L⁻¹) fazendo com que as demais atividades observadas fossem negligenciáveis. No entanto, os valores obtidos neste trabalho podem ser considerados comparativamente maiores aos obtidos em *Coriolus versicolor* (4,406U mL⁻¹) e *Funalia Trogi* (4,880U mL⁻¹) (Kahraman & Gurdal, 2002); em *Trametes trogii* (0,55U mL⁻¹) utilizando extrato de malte como fonte de C (Levin et al., 2003). Em estudos utilizando diferentes fontes de C para produção de lacases foi observado que as fontes utilizadas foram eficientes e rapidamente utilizadas, resultando em altos níveis de atividade da enzima, principalmente com o uso de glicose ou celobiose (60 – 65U mL⁻¹). Quando foi usado glicerol que tem um consumo mais baixo que a glicose, os níveis da enzima foram semelhantes, ainda que após um período mais longo de cultivo. No entanto a lactose e α -lactose foram pouco consumidas durante o crescimento fúngico e resultaram em menor atividade enzimática (Galhaup et al., 2002).

A produção de lacases está na dependência tanto da fonte de C quanto da de nitrogênio (N) (Galhaup et al., 2002). Os autores estudaram o efeito de diferentes fontes de N orgânico na produção de lacase por *T. pubescens*. A maior produção da enzima (310U mL⁻¹) foi obtida quando utilizada a peptona (80mM) como única fonte de N. A substituição da peptona por extrato de levedura levou a um decréscimo na produção da enzima ($\pm 100U mL^{-1}$), porém o crescimento do microrganismo não foi afetado. Neste trabalho foi utilizada como fonte de N o extrato de levedura, o que talvez possa explicar as baixas concentrações encontradas. Apesar da importância da fonte de N para formação de lacases ter sido apontada recentemente (Gianfreda et al., 1999), alguns autores relatam que sua atividade é maior em condições limitantes de N (Eggert et al., 1996; Pointing et al., 2000).

Entre os fungos estudados neste trabalho algumas linhagens apresentaram um complexo enzimático capaz de descolorir o corante Remazol Brilliant Blue R. A absorvância dos meios de cultivo suplementados com remazol decresceu após 14 dias de cultivo. Das oito linhagens testadas (Tabela 1), apenas as duas P3SA1F e P11SA2F apresentaram 42 e 47% de descoloração, respectivamente, apesar de apresentarem apenas atividade para lacase. Comparando estas linhagens com a linhagem de *Ganoderma* sp (GASI3.4), que serviu de controle neste estudo, verificou-se que em termos de descoloração do remazol o comportamento de ambas foi promissor sugerindo a possibilidade de aplicação destas linhagens em estudos de biodegradação e biorremediação.

As demais linhagens estudadas tiveram a porcentagem de descoloração entre 1,3 e 25%, mesmo quando apresentaram maior produção de biomassa. A linhagem Q4SR1F apesar de ter apresentado atividades para LiP, MnP e lacase, mesmo em quantidades pequenas, apresentou uma porcentagem de descoloração do RBBR de apenas 6%. Não foi observado um padrão quanto à enzima responsável pela descoloração. Por exemplo, para as linhagens Q4SR1F (25%) e P11SA4F (10%) provavelmente a enzima responsável foi a LiP, enquanto que para as linhagens P3SA1F e P11SA2F foi a lacase.

Este tipo de descoloração é um método simples para avaliar a capacidade degradativa dos microrganismos. Portanto, os resultados sugerem que as linhagens P3SA1F e P11SA2F tem potencial para degradar agrotóxicos, principalmente, os herbicidas propanil e quinclorac, contidos no solo de onde foram isoladas. Para testar a eficiência destas linhagens como degradadoras serão necessários estudos posteriores com a finalidade de explorar o potencial biotecnológico destas fontes alternativas de enzimas.

Referências Bibliográficas

- ARORA, D. S.; CHANDER, M.; GILL, P. K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 115-120, 2002.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 78A-87A, 1994a.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Pollutant degradation by white rot fungi. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 138, p. 49-72, 1994b.
- BOOMINATHAN, K.; D'SOUZA, T. M.; NAIDU, P. S.; DOSORETZ, C. G.; REDDY, C. A. Temporal expression of the major lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3946-3450, 1993.
- DITTMER, J. K.; PATEL, N. J. DHAWALE, S. W.; DHAWALE, S. S.; Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. **FEMS Microbial Letters**, v. 149, p. 65-70, 1997.
- EGGERT, C.; TEP, U.; ERIKSSON, K. E. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase, and manganese peroxidase. In: JEFFRIES, T.; VIKARI, L. (Ed.). **Enzymes for pulp and paper processing**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 130-150. (ACS Symposium Series, 655).
- EPAGRI. Estação Experimental de Itajaí. **Qualidade ambiental do ecossistema arroz irrigado**. Itajaí: EPAGRI, 2001.
- GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.
- GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, p. 1-25, 1999.

HAMMEL, K. E. Oxidation of aromatic pollutants by lignin degrading fungi and their extracellular peroxidases. **Metal Ions Biology System**, v. 28, p. 41-60, 1992.

HIGUCHI, T. Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. In.: LEWIS, N. G.; PAICE, M. G. (Ed.). **Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 482-502. (ACS Symposium Series, 399).

HOFRICHTER, M.; Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 215-217, 2002.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.

LEVIN, L.; VIALE, A.; FORCHIASSIN, A. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, p. 1-5, 2003.

MOMOYHARA, I.; MATSUMOTO, Y.; IUZU, A. Involvement of veratryl alcohol and active oxygen species in degradation of a quinone compound by lignin peroxidase. **FEBS Letters**, v. 273, p. 159-162, 1990.

MOREIRA, P. R.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; POLÓNIA, I.; MALCATA, F. X.; DUARTE, J.C. Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via novel *Bjerkandera* sp strain. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 107-111, 2001.

PASTI, M. B.; CROWFORD, D. L. Relationships between the abilities of streptomycetes to decolorize three anthron-type dyes and to degrade ligninocellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 902-907, 1991.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20-33, 2001.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v. 92, p. 139-144, 2000.

REDDY, C. A. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 91-107, 1993.

REDDY, C. A.; D'SOUZA, T. M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbial Review**, v. 13, p. 137-152, 1994.

REID, I. D.; McDONALD, J. C. Anthracenediethanol inhibits lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* by competing for oxidation by lignin peroxidase, and not by trapping single oxygen. **Biodegradation**, v. 2, p. 61-69, 1991.

ROTHSCHILD, N.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. G. Ligninolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1833-1838, 1995.

ROTHSCHILD, N.; NOVOTNÝ, C.; SASEK, V.; DOSORETZ, C. G. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 627-633, 2002.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. Effects of Mn^{2+} e NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decolorization by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 391-396, 1999.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 1-17, 1995.

VYAS, B. R. M.; MOLITORIS, H. P. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3919-3927, 1995.