



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

*Faculdade de Engenharia de Alimentos*

*Departamento de Ciência de Alimentos*

**FUNGOS ISOLADOS DE MACRO-ORGANISMOS MARINHOS BRASILEIROS:  
DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

**Rafaella Costa Bonugli Santos**  
Bióloga

**Profa. Dra. Lucia Regina Durrant**  
Orientadora

**Dra. Lara Durães Sette**  
Co-orientadora

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Santos, Rafaella Costa Bonugli  
Sa59f Fungos isolados de macro-organismos marinhos brasileiros:  
diversidade genética e potencial biotecnológico / Rafaella Costa Bonugli Santos. -  
- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Lucia Regina Durrant  
Co-orientador: Lara Durães Sette  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Engenharia de Alimentos

1. Fungos filamentosos marinhos. 2. Diversidade genética. 3.  
Descoloração do corante. 4. Salinidade. I. Durrant, Lucia Regina. II. Sette,  
Lara Durães. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia  
de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Fungi isolated from brasilian marine macro-organisms: genetic diversity and  
biotechnological potential

Palavras-chave em inglês (Keywords): Marine-derived fungi, Genetic diversity, Dye  
decolorization, Salinity

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant  
Marta Cristina Teixeira Duarte  
Ísis Serrano Silva  
Andrea Roberta Clemente  
Eder da Costa dos Santos

Data da defesa: 18/05/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Esse exemplar corresponde à redação final da tese defendida em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por Rafaella Costa Bonugli Santos aprovado pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

(Orientadora) - FEA-UNICAMP

---

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

(Membro) – CPQBA - UNICAMP

---

Dra. Ísis Serrano Silva

(Membro) - Wisetec Centro de Pesquisa

Dra. Andrea Roberta Clemente

(Membro) - UNIARARAS

---

Dr. Eder da Costa dos Santos

(Membro) - USP

---

Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

(Membro) - Universidade de Mogi das Cruzes

---

Dra. Eleni Gomes

(Membro-Suplente) - UNESP

---

Dr. André Rodrigues

(Membro-Suplente) – UESC



*Dedicatória,*

*Aos meus pais,  
pela dedicação, pelo apoio e por todo amor.*

*Ao Davis, meu melhor amigo, meu marido, e meu amor,  
pela compreensão e apoio durante os anos de desenvolvimento deste projeto e por sempre  
inspirar o que há de melhor em mim e em todos que tem o privilégio de conviver com ele.*

## *Agradecimentos,*

À professora Lucia Regina Durrant, pela oportunidade, orientação, e confiança na realização deste trabalho.

À Professora Lara Durães Sette, pela orientação, compreensão, paciência, carinho e apoio, sempre me impulsionando a ir mais além.

A Dra. Valéria Maia de Oliveira e a Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, por terem me permitido participar do laboratório (DRM-CPQBA), pela experiência e amizade.

A todos os amigos da Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA). Obrigada pelo carinho, apoio, companheirismo e por tudo que aprendemos juntos todos os dias: André Rodrigues, Bárbara, Bruna, Cláudia, Cristina, Cynthia, Giselle, Karen, João Kleber, Leandro, Mariana, Mariana Magrini, Michel, Milena, Natalia, Paula, Patrícia, Rebeca, Tiago Rodrigues, Thiago Simões e Suzan.

A todo o pessoal do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (FEA – UNICAMP) pelo carinho, suporte e colaboração.

À minha família, minha irmã Isabella, meus tios, meus avôs, meus primos, meus sogros Pedro e Leonilda, e todos aqueles que compartilham comigo minhas alegrias e minhas angústias.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a elaboração desta tese.





## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
<b>1. Fungos derivados de ambientes marinhos</b> .....	4
<b>2. Enzimas Ligninolíticas</b> .....	7
<b>2.1 Lignina Peroxidase (LiP, E.C:1.11.1.14)</b> .....	8
<b>2.2 Manganês Peroxidase (MnP, E.C:1.11.1.13)</b> .....	9
<b>2.3 Lacase (Lac, E.C:1.10.3.2)</b> .....	10
<b>2.4 Fungos produtores de enzimas ligninolíticas</b> .....	11
2.4.1 Produção de Enzimas Ligninolíticas por fungos derivados marinhos .....	13
<b>2.5 Aplicação biotecnológica das enzimas ligninolíticas</b> .....	14
<b>2.6 Estudo de Genes envolvidos na atividade ligninolítica</b> .....	17
<b>3. Taxonomia de Fungos Filamentos</b> .....	19
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	38
<b>CAPÍTULO 1. Diversidade genética de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos e potencial biotecnológico</b>	
<b>RESUMO</b> .....	39
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>2.1 Fungos associados a cnidários marinhos</b> .....	41
<b>2.2 Avaliação da diversidade genética e caracterização taxonômica</b> .	42
2.2.1 Extração e amplificação do DNA genômico.....	42
2.2.2 ARDRA, Sequenciamento e Análise filogenética .....	43
<b>2.3 Avaliação da atividade de enzimas ligninolíticas</b> .....	44
2.3.1 Determinação enzimática .....	44
2.3.1.1 Lignina peroxidase (LiP, E.C:1.11.1.14).....	45
2.3.1.2 Manganês peroxidase (MnP, E.C:1.11.1.13).....	45
2.3.1.3 Lacase (E.C:1.10.3.2) .....	46

2.4	Avaliação da produção de biosurfactantes .....	46
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	46
3.1	Diversidade genética e caracterização taxonômica de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos .....	46
3.2	Potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos .....	53
4.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
4.1	Diversidade genética e caracterização taxonômica de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos .....	57
4.2	Potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos .....	59
5.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
	<b>REFERENCIAS</b> .....	64

**CAPÍTULO 2. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin  
peroxidase by brazilian marine-derived fungi**

<b>ABSTRACT</b> .....	73
1. <b>INTRODUCTION</b> .....	74
2. <b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	75
2.1 Marine-derived filamentous fungi .....	75
2.2 Taxonomic characterization of marine-derived filamentous fungi and phylogenetic analyses .....	76
2.3 Activity of ligninolytic enzymes in liquid media .....	77
2.4 Time course for MnP produced by <i>Mucor racemosus</i> .....	78
2.5 Enzymes assays .....	78
2.6 Experimental design .....	79
3. <b>RESULTS</b> .....	80
4. <b>DISCUSSION</b> .....	86
5. <b>CONCLUSION</b> .....	88
<b>REFERENCES</b> .....	89

### **CAPÍTULO 3. Diversity of laccase genes and extracellular activity in marine-derived basidiomycetes**

<b>ABSTRACT</b> .....	93
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	94
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	96
<b>2.1</b> Marine-derived basidiomycetes .....	96
<b>2.2</b> Molecular characterization of marine-derived basidiomycetes and phylogenetic analyses .....	96
<b>2.3</b> Growth conditions and induction of laccase .....	97
<b>2.4</b> Laccase assay .....	98
<b>2.5</b> Laccase genes from marine-derived basidiomycetes .....	98
2.5.1 PCR amplification .....	98
2.5.2 DNA sequencing and sequence analysis .....	99
<b>3. RESULTS</b> .....	100
<b>3.1</b> Laccase activity .....	101
<b>3.2</b> Laccase gene diversity .....	103
<b>4. DISCUSSION</b> .....	106
<b>4.1</b> Laccase activity .....	106
<b>4.2</b> Laccase gene diversity .....	108
<b>5. CONCLUSION</b> .....	109
<b>REFERENCES</b> .....	111

### **CAPÍTULO 4. Efficient dye decolorization and ligninolytic activity by marine-derived basidiomycetes**

<b>ABSTRACT</b> .....	117
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	118
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	120
<b>2.1</b> Marine-derived basidiomycetes .....	120
<b>2.2</b> Ligninolytic activities and induction of MnP and LiP .....	120
2.2.1 Enzymes assays .....	121
<b>2.3</b> Decolorization on solid media supplemented with RBBR .....	121
<b>2.4</b> Determination of decolorization ability on liquid medium supplemented with RBBR .....	122

<b>3.</b>	<b>RESULTS</b> .....	123
<b>3.1</b>	Ligninolytic activities and induction of MnP and LiP .....	123
<b>3.2</b>	Decolorization ability .....	128
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	132
<b>4.1</b>	Ligninolytic activities and induction of MnP and LiP .....	132
<b>4.2</b>	Decolorization ability .....	134
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	136
	<b>REFERENCES</b> .....	138
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	144
	<b>ANEXOS</b> .....	146

## ÍNDICE DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Principais características das enzimas ligninolíticas.....	8
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos fungos degradadores de lignina (Tuomela et al., 2000) .....	11

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Atividade de lacase em caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl após 7 dias de cultivo .....	54
<b>Tabela 2.</b> Atividades de MnP em caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl após 7 dias de cultivo .....	55
<b>Tabela 3.</b> Atividade de LiP em caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl após 7 dias de cultivo .....	56
<b>Tabela 4.</b> Atividade de redução da tensão superficial por fungos filamentos associados a cnidários marinhos .....	57
<b>Tabela 5.</b> Potencial biotecnológico dos fungos filamentosos associados a cnidários marinhos selecionados pelo presente trabalho e co-relacionados com os estudos de da Silva et al., (2008) (descoloração do corante RBBR) e Passarini, (2008) (degradação de HPAs).....	62

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1.</b> Marine-derived fungi identification and data from sampling, isolation and accession numbers .....	80
<b>Table 2.</b> Ligninolytic activities in malt extract 2% (w/v) plus 3% (w/v) NaCl ...	82
<b>Table 3.</b> Central composite design matrix with the real and coded values (in parentheses) for laccase and MnP activity .....	83
<b>Table 4.</b> Regression coefficient for <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 MnP activity .	84
<b>Table 5.</b> ANOVA of the quadratic model for MnP activity (UI/L) by marine-derived fungus <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 .....	84

### **CAPÍTULO 3**

<b>Table 1.</b> Marine-derived basidiomycetes identification and data from sampling, isolation and accession numbers .....	100
<b>Table 2.</b> Strain, results of PCR amplifications and intron information of laccase genes from marine-derived basidiomycetes .....	104

### **CAPÍTULO 4**

<b>Table 1.</b> Characteristics of the synthetic dye RBBR .....	118
<b>Table 2.</b> LiP and MnP activities by marine-derived basidiomycetes in media MA2 and B&K with inductors after 7 days of incubation .....	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

### REVISAO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo do <i>operon</i> ribossomal dos fungos.....	20
---	----

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Ocorrência de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos caracterizados como Não-Identificados (NI) em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto	48
	48
	49
	49
	51
	52
	81
	85

.....  
.....  
**Figura 2.** Ocorrência de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos caracterizados como *Penicillium* em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto  
.....  
.....

**Figura 3.** Ocorrência de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos caracterizados como *Aspergillus* em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto  
.....  
.....

**Figura 4.** Ocorrência de fungos filamentosos classificados no grupo Dematiaceae em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto

**Figura 5.** Figura 5. Árvore filogenética estruturada com base nas sequências de DNAr 28S (500 pb) dos fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, ordem Eurotiales (Ascomycota)  
.....

**Figura 6.** Árvore filogenética estruturada com base nas sequências de DNAr 28S (500 pb) dos fungos do Filo Ascomycota, ordens Hypocreales (Hyp),



Pleosporales (Ple), Xylariales (Xyl), Capnodiales (Cap), Botryosphaeriales (Bot) e Filo Zygomycota, ordem Mucorales (Muc)	86
--	----

**CAPÍTULO 2**

<b>Figure 1.</b> Phylogenetic tree based on ITS analyses showing closest relatives of marine-derived fungi isolates (Kimura two-parameter model; neighbor-joining algorithm and 1000 replicate bootstrap)	101
--	-----

<b>Figure 2.</b> Contour curve and response surface for the MnP activity of <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 as a function of: salinity (%) versus wheat bran, according to the CCD	102
---	-----

<b>Figure 3.</b> Time course for MnP activity produced by <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	102
---	-----

**CAPÍTULO 3**

<b>Figure 1.</b> Phylogenetic tree based on ITS analyses (600 bp) showing closest relatives of marine-derived fungal isolates (Kimura two- parameter model; Neighbor-Joining algorithm and 1,000 pseudo- replicates bootstrap). .....	105
---	-----

<b>Figure 2.</b> Laccase activity of <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061: <b>A)</b> 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2+3%NaCl, MA2ASW and B&K; <b>B)</b> inductors addition in media MA2	106
--	-----

and B&K after 7 days of incubation

.....  
**Figure 3.** Laccase activity of *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 : **A)** 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2+3%NaCl, MA2ASW and B&K; **B)** inductors addition in media MA2 and B&K after 7 days of incubation

.....  
**Figure 4.** Laccase activity of *Peniophora* sp. CBMAI 1063: **A)** 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2+3%NaCl, MA2ASW and B&K; **B)** inductors addition in media MA2 and B&K after 7 days of incubation

.....  
**Figure 5.** Alignment of the deduced amino acid sequences between cbr I and cbr II arranged according to the different marine-derived basidiomycetes laccase sequence. The sequences are compared with the corresponding sequences from *Trametes hirsuta* (ACC43989), *Pycnoporus coccine* (BAB69776), *Pleurotus sajor-caju* (CAD45380), *Volvariella volvacea* (AAR0358) and *Trametes versicolor* (U44431). Amino acids with a  $\geq 50\%$  match are highlighted .....

**Figure 6.** Phylogenetic tree of marine-derived basidiomycetes laccase sequences. The tree was constructed based on an amino acid alignment. Bootstrapping was performed with 1000 pseudo-replicates in Kimura 2-parameter analysis. Bootstrap values greater

than 50% are indicated at branch nodes and the NJ tree was rooted using sequences of the ascomycetes *Colletotrichum lagenarium* (GenBank accession no. AB055709)

.....

#### CAPÍTULO 4

<b>Figure 1.</b> LiP activity by marine-derived basidiomycetes in 7, 14 and 21 days of incubation in MA2 (black), MA2 plus 3% NaCl (gray) and MA2ASW (dark gray)	
<b>Figure 2.</b> MnP activity by marine-derived basidiomycetes in 7, 14 and 21 days of incubation in MA2 (black), MA2 plus 3% NaCl (gray) and B&K (dark gray) .....	125
<b>Figure 3.</b> RBBR decolorization by <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061, <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 and <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 after 7,14 and 21 days of cultivation in solid medium MA2 without salt .....	128
<b>Figure 4.</b> RBBR decolorization by <i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061 and <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062 after 21 days of cultivation in solid medium MA2 in saline conditions	129
	130
	131
	132

.....

.....

**Figure 5.** RBBR decolorization by marine-derived basidiomycetes during 7 days of incubation in medium MA2 plus RBBR dye: *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 500 mg L<sup>-1</sup> RBBR ( ); *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 1000 mg L<sup>-1</sup> RBBR ( ); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 500 mg L<sup>-1</sup> ( ); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 1000 mg L<sup>-1</sup> ( ); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 500 mg L<sup>-1</sup> ( ); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 1000 mg L<sup>-1</sup> ( )

.....

.....

**Figure 6.** MnP (A) and laccase (B) activities by three marine-derived basidiomycetes in microbial decolorization during 7 days of incubation in medium MA2 plus RBBR dye: *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 500 mg L<sup>-1</sup> RBBR ( ); *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 1000 mg L<sup>-1</sup> RBBR ( ); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 500 mg L<sup>-1</sup> ( ); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 1000 mg L<sup>-1</sup> ( ); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 500 mg L<sup>-1</sup> ( ); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 1000 mg L<sup>-1</sup> ( )

**Figure 7.** Absorption spectra during enzymatic decolorization (mycelia-free) of RBBR by: **(A)** *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061; **(B)** *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062; and **(C)** *Peniophora* sp. CBMAI 1063 .....

## RESUMO

Os ecossistemas marinhos representam uma fonte potencial de recursos genéticos para diversas aplicações biotecnológicas. Neste sentido, os fungos filamentosos derivados do ambiente marinho podem ser considerados estratégicos para a produção de compostos naturais bioativos e para aplicações em processos industriais que requerem tolerância às condições salinas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a diversidade genética de fungos derivados de macro-organismos marinhos (cnidários e esponjas) e o potencial destes isolados para a biorremediação de poluentes ambientais. A caracterização da diversidade dos fungos isolados de cnidários marinhos demonstrou que a maioria dos isolados pertencem ao filo Ascomycota, sendo identificado apenas um único isolado do filo Zygomycota (gênero *Mucor*). Diversos fungos filamentosos isolados dos cnidários marinhos apresentaram potencial biotecnológico para produção das enzimas ligninolíticas. Entretanto, os fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 (Ascomycota) e o *Mucor racemosus* CBMAI 847 (Zygomycota) foram selecionados devido à capacidade de produção de quantidades significativas de enzimas ligninolíticas na triagem inicial. Esses três isolados foram submetidos à avaliação de diferentes fatores (fonte de carbono, farelo de trigo e salinidade) envolvidos na atividade ligninolítica. A atividade da lacase e MnP foi ampliada quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono, contudo LiP foi produzida apenas no meio contendo extrato de malte. A adição do farelo de trigo não influenciou a produção das enzimas, contudo, a salinidade foi o fator mais importante na atividade ligninolítica. Valores mais altos de MnP e lacase foram produzidos por *M. racemosus* CBMAI 847 em 12,5% e 23% de salinidade, sendo o primeiro relato da atividade ligninolítica para o gênero *Mucor*. Levando-se em consideração que os fungos basidiomicetos são os principais produtores de enzimas ligninolíticas, três basidiomicetos isolados de esponjas marinhas, identificados como *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 e

*Peniophora* CBMAI 1063 foram investigados quanto à atividade de LiP, MnP e Lac, diversidade dos genes que codificam para a atividade extracelular da lacase e degradação do corante Remazol Brilhante Blue R (RBBR). A atividade enzimática foi altamente significativa para os três basidiomicetos derivados marinhos em meio contendo extrato de malte como fonte de carbono (condição não salina) e em meio formulado com água do mar artificial (condição salina). A atividade ligninolítica aumentou quando o farelo de trigo e  $\text{CuSO}_4$  foram adicionados ao meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono. Uma elevada diversidade de genes que codificam para a lacase foi encontrada nos três basidiomicetos estudados, sugerindo a detecção de novas lacases, que podem apresentar características diferentes das produzidas por micro-organismos terrestres. Em adição, os três basidiomicetos estudados apresentaram capacidade significativa de descoloração do corante RBBR. O fungo *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 foi o mais eficiente na degradação do corante RBBR, com 100% de degradação após 3 dias de cultivo e a MnP foi a principal enzima produzida durante a descoloração do corante por este fungo. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial biotecnológico dos fungos derivados de ambientes marinhos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos (ascomicetos, zigomicetos e basidiomicetos), principalmente na degradação de poluentes por enzimas ligninolíticas em ambiente ou processos salinos, como na biorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e vários compostos aromáticos derivados do derramamento de petróleo nos oceanos e mares ou no tratamento de efluentes têxteis, os quais contêm altas concentrações de sais.

**Palavras chave:** Fungos filamentosos marinhos, diversidade genética, atividade ligninolítica, salinidade, descoloração do corante RBBR.

## ABSTRACT

Marine ecosystems represent potential genetic resources for various biotechnological applications. In this sense, the fungi derived from marine environments can be considered strategic for the production of natural bioactive compounds and for applications in industrial processes that require tolerance to saline conditions. In this context, this study aimed to evaluate the biotechnological potential of fungi derived from marine macroorganisms (cnidarians and sponges) on the degradation of environmental pollutants, as well as to characterize the diversity of isolates derived from such samples. Our results showed that most marine-derived fungal isolates belong to the phylum Ascomycota, and only one isolate was identified as representative of the genus *Mucor*, phylum Zygomycota. Several filamentous fungi isolated from marine cnidarians showed potential for industrial applications. However, *Aspergillus sclerotiorum* CBMA 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMA 857 (Ascomycota) and *Mucor racemosus* CBMAI 847 (Zygomycota) were selected for their ability to produce significant amounts of ligninolytic enzymes in the initial screening. These three isolates were submitted to experiments related to the influence of different variable parameters (carbon source, wheat bran and salinity) on ligninolytic activity. Lac and MnP activities were enhanced when glucose was used as carbon source. However LiP was produced only in medium containing malt extract. According to the statistical analysis, the addition of wheat bran did not influence the enzyme productions, but the salinity was the most important parameter on the ligninolytic activities. The highest amounts of MnP and laccase were produced by *M. racemosus* CBMAI 847 in 12.5% and 23% salinity and this was the first report related to ligninolytic activity for the genus *Mucor*. Taking into account that basidiomycetes are the major producers of ligninolytic enzymes, three basidiomycetes isolates from marine sponges identified as *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 were investigated in relation to LiP, MnP and Lac activities, as well as the diversity of extracellular laccase genes and the decolorization of



Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye. The enzyme activity was highly significant for the three marine-derived basidiomycetes in medium containing malt as carbon source (non-saline condition) and in medium formulated with artificial seawater (saline condition). Ligninolytic activity was enhanced when wheat bran and  $\text{CuSO}_4$  were added to the culture medium containing glucose as carbon source. A high diversity of Lac genes was found in the three basidiomycetes studied, suggesting the detection of new laccase, which may present different characteristics from those produced by terrestrial microorganisms. In addition, the three basidiomycetes studied showed significant capacity to decolorize the RBBR dye. *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 was the most efficient fungus in the dye decolorization, presenting 100% degradation after 3 days of cultivation in liquid medium, and MnP was the main enzyme produced during RBBR decolorization by the three marine-derived fungi. Results from our study revealed the biotechnology potential of marine-derived fungi belonging to different taxonomic groups (ascomycetes, zygomycetes and basidiomycetes), in the degradation of pollutants by ligninolytic enzymes in saline environments and/or processes, such as the bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) derived from oil spills in the ocean or in the treatment of industrial (textile) colored effluents, which contain high concentrations of salts.

**Keywords:** Marine-derived fungi, ligninolytic enzymes, saline conditions, genetic diversity, RBBR decolorization.

## INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos derivados de nichos ecológicos pouco explorados, como o ambiente marinho, têm sido foco de grande interesse devido principalmente, ao fato de pouco se conhecer sobre a biodiversidade e recursos genéticos dos micro-organismos que habitam esses ecossistemas. Acredita-se que as características físico-químicas únicas do ambiente marinho propiciaram aos fungos que habitam estes ambientes, adaptações fisiológicas especiais, as quais podem ser exploradas do ponto de vista biotecnológico.

Fungos associados a macro-organismos marinhos tem sido foco de inúmeros estudos para a produção de novas moléculas bioativas. Apesar de recente, a atividade de enzimas extracelulares capazes de degradar a madeira também tem sido relatada para fungos derivados de ambiente marinho. Entre estas enzimas, as ligninolíticas, principalmente a lacase, manganês peroxidase e a lignina peroxidase são fontes potenciais de recursos genéticos para aplicação em processos de biorremediação de diversos poluentes ambientais, incluindo os efluentes altamente coloridos provenientes de indústrias têxteis e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e outros compostos aromáticos derivados do derramamento de petróleo nos oceanos e sedimentos.

A degradação de muitos poluentes ambientais, como os efluentes têxteis, muitas vezes é limitada quando se utiliza micro-organismos terrestres, principalmente devido aos valores extremos de pH e a alta salinidade destes efluentes. Neste contexto, os fungos derivados de ambiente marinho podem ser considerados estrategicamente importantes para os estudos de degradação destes poluentes, visto que estão adaptados às condições de teores elevados de sal e valores extremos de pH do ambiente marinho.

Levando-se em consideração que pouco se conhece sobre a diversidade de fungos associados a ambientes marinhos no Brasil e o potencial biotecnológico destes micro-organismos, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética de

fungos associados ao ambiente marinho e o potencial destes isolados para a biorremediação de poluentes ambientais.

Neste sentido, 116 fungos filamentosos isolados de cnidários marinhos no âmbito do projeto FAPESP 05/1213-8, intitulado “Fungos derivados de ambientes marinhos: isolamento, caracterização taxonômica e avaliação do potencial biotecnológico” (coordenado pela Dra. Lara D. Sette, CPQBA/UNICAMP), foram avaliados quanto à diversidade genética no capítulo 1. Neste capítulo o potencial biotecnológico dos isolados quanto à produção de enzimas ligninolíticas e biosurfactantes foi investigado. O objetivo principal deste capítulo, além da avaliação da diversidade genética, foi a seleção de fungos promissores na produção de enzimas ligninolíticas com potencial aplicação em processos de biorremediação. Os resultados obtidos nesta triagem, juntamente com o resultado de outros estudos de degradação de poluentes realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Lara Sette (CPQBA/UNICAMP) com os mesmos isolados, selecionaram 2 isolados do filo Ascomycota (*Aspergillus sclerotiorum* CBMA 849 e *Cladosporium cladosporioides* CBMA 857) e 1 isolado do filo Zygomycota (*Mucor racemosus* CBMA 847) para a continuação dos estudos enzimáticos.

O sistema ligninolítico pode ser afetado por diferentes fatores abióticos e bióticos. Assim, no capítulo 2, os isolados selecionados foram avaliados quando à produção das enzimas ligninolíticas em meio de cultivo contendo extrato de malte ou glicose como fonte de carbono. Em adição, o delineamento experimental baseado na análise estatística permitiu a avaliação da influência da salinidade e do farelo de trigo (conhecido na literatura como um indutor da atividade ligninolítica). Neste capítulo, foi possível determinar o potencial biotecnológico para produção das enzimas ligninolíticas em condições salinas para futuros estudos de degradação de poluentes em ambientes com alta salinidade. Além disso, é importante destacar que o grupo de pesquisa da Dra. Lara Sette vem desenvolvendo estudos paralelos de aplicação destes fungos na degradação dos HPAs pireno e benzo[a]pireno.

Apesar dos fungos pertencentes ao filo Ascomycota terem sido relatados em literatura como produtores de enzimas ligninolíticas, os fungos do filo Basidiomycota são os mais estudados na biorremediação, principalmente devido aos elevados valores de enzimas ligninolíticas produzidas por esses organismos. Nenhum representante deste filo foi isolado das amostras de cnidários marinhos, contudo, três basidiomicetos foram isolados de esponjas marinhas pelo grupo da Dra. Lara Sette no âmbito do projeto FAPESP 05/60175-2, intitulado “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de micro-organismos associados” (coordenado pelo Dr. Roberto G.S. Berlinck, IQ-USP-SC), os quais foram, no presente trabalho, caracterizados taxonomicamente (capítulo 3), avaliados quanto à produção de enzimas ligninolíticas (capítulos 3 e 4) e quanto ao potencial para degradação de poluentes ambientais (capítulo 4).

No capítulo 3, os três basidiomicetos isolados de esponjas marinhas foram avaliados quanto a atividade da lacase em meio de cultivo: 1) sem a presença de sal; 2) contendo 3% NaCl; e 3) formulado com água do mar artificial (ASW). A atividade de indutores na produção da lacase foi mostrada também neste capítulo. Em adição, a diversidade de genes da lacase foi avaliada também, visto que, o conhecimento e a determinação do gene ou genes potencialmente envolvidos na atividade extracelular da enzima é de extrema importância para o avanço nos estudos de evolução, diversidade e funcionalidade.

O quarto, e último capítulo, descreve a atividade das enzimas ligninolíticas LiP e MnP nas mesmas condições de cultivo do capítulo 3, bem como a influência dos indutores na produção destas enzimas pelos basidiomicetos derivados marinhos. Neste capítulo, foi investigado o potencial biotecnológico na degradação do corante têxtil RBBR pelos basidiomicetos estudados. Cabe ressaltar que o corante RBBR é utilizado para a seleção de isolados capazes de degradar HPAs, visto que este corante é um derivado do HPA antraceno.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1. Fungos derivados de ambientes marinhos**

Os oceanos cobrem aproximadamente 71% da superfície da Terra e são considerados como grandes reservatórios de recursos naturais (Karl, 2007). No entanto, a extensão da biodiversidade marinha, especialmente de micro-organismos, é pouco conhecida. Estima-se que a diversidade biológica dos ecossistemas marinhos pode ser mais elevada do que em florestas tropicais (Larsen et al., 2005). As comunidades microbianas marinhas são compostas por organismos que podem ser encontrados não só nas águas superficiais, mas também em profundezas abissais, nas regiões litorâneas e oceânicas, associados a uma variedade de substratos, incluindo esponjas, algas, madeiras, sedimentos, moluscos, plantas, peixes e corais (Hill, 2005; Surajit et al., 2006).

A associação entre micro e macro-organismos é uma característica proeminente dos ecossistemas marinhos. Corais e esponjas são conhecidos por manterem relações simbióticas com micro-organismos como cianobactérias, fungos e bactérias, o que os torna um conglomerado em miniatura de vários organismos. Entretanto, para muitos dos organismos marinhos a natureza destas associações não foi, até o presente momento, rigorosamente investigada e definida (Taylor et al., 2007). A associação entre fungos e invertebrados marinhos tem sido descrita na literatura (Taylor et al., 2007; Wang et al., 2008; Baker et al., 2009). Recentemente, Menezes et al. (2009) relatam o isolamento de 24 diferentes gêneros de fungos filamentosos a partir de diferentes invertebrados marinhos, com uma seleção de certos grupos taxonômicos, de acordo com o macro-organismo hospedeiro.

Pesquisas conduzidas principalmente durante a metade do século passado permitiram uma compreensão do papel dos micro-organismos no ambiente marinho. Em contraste com o ambiente terrestre, a vida no mar é dominada em termos de biomassa e metabolismo, por micro-organismos dos três domínios de vida (Bacteria, Archaea e Eukarya). Nos oceanos, os

micro-organismos fototróficos que coletam a energia solar, produzem energia para os processos heterotróficos que ocorrem no ecossistema marinho (Karl, 2007).

Os fungos marinhos não formam um grupo taxonômico, mas sim ecológico (Hyde et al., 2000). No ambiente marinho, são organismos heterotróficos, com papel principal na decomposição do tecido vegetal e animal (celulose, lignina, queratina, entre outros) e na reciclagem de nutrientes (Bugni e Ireland, 2004). A temperatura é o parâmetro mais importante que controla a distribuição dos fungos marinhos, embora a pressão hidrostática e a disponibilidade de oxigênio sejam também fatores importantes (Surajit et al., 2006).

Os estudos na área de micologia marinha são relativamente recentes e renderam até o momento a classificação de dois grupos de fungos marinhos, com base em sua capacidade de crescer e se reproduzir na água do mar. São chamados fungos marinhos obrigatórios aqueles que crescem e esporulam exclusivamente na água do mar, e seus esporos são capazes de germinar neste ambiente; e fungos marinhos facultativos aqueles terrestres e aquáticos com adaptações que permitem seu crescimento no ambiente marinho (Kohlmeyer e Kohlmeyer, 1979). De acordo com Hyde et al. (2000), aproximadamente 800 espécies de fungos marinhos obrigatórios foram encontrados. Porém, como estes micro-organismos não podem ser definidos somente por critérios fisiológicos, necessitando de um vasto estudo de sua ecologia para serem classificados como fungos marinhos obrigatórios. Um grande número de fungos isolados de amostras marinhas não foi comprovadamente classificado como micro-organismo marinho obrigatório ou facultativo. Assim, foi criada a expressão “fungos derivados de ambiente marinho” (*marine-derived fungi*), visando uma classificação mais geral para estes organismos (Osterhage, 2001).

Poucos são os estudos de micro-organismos marinhos ao longo da costa brasileira. Entre os fungos filamentosos caracterizados, os gêneros com maior incidência são:

*Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Berlinck et al., 2004; da Silva et al., 2008; Menezes et al., 2009).

O interesse pelo isolamento e avaliação do potencial biotecnológico de microorganismos pertencentes a nichos ecológicos pouco explorados tem crescido nos últimos anos. Recentemente, estudos com enfoque na identificação e isolamento de compostos a partir da diversidade microbiana de origem marinha vêm se expandindo (Bugni e Ireland, 2004; Li et al., 2004; Amagata et al., 2006; Boot et al., 2006; Liu et al., 2006; Menezes et al., 2009), demonstrando o potencial biotecnológico destes organismos. Segundo Bugni e Ireland (2004), os fungos derivados de ambientes marinhos são uma fonte de diversidade química, e este fato é atestado pelos 277 compostos novos que foram isolados e descritos. Alguns trabalhos relacionados ao isolamento e produção de metabólitos secundários por fungos filamentosos marinhos ou derivados de ambiente marinho foram reportados na literatura (Kobayashi et al., 1996; Namikoshi et al., 2001; Bugni e Ireland, 2004; Li et al., 2004; Boot et al., 2006; Amagata et al., 2006; Liu et al., 2006; Rocha et al., 2009), demonstrando o potencial biotecnológico destes organismos.

As principais atividades biológicas relacionadas aos fungos derivados marinhos são: propriedades antimicrobianas e antitumorais, inibição de ciclo celular, antagonistas de fatores de ativação, atividade antiviral, inibição de fosfatase e quinase (Bugni e Ireland, 2004). Entretanto, seu potencial pode ser explorado em diversas áreas, como na produção de diferentes enzimas (D'Souza et al., 2006; Wang et al., 2006; Le Crom et al., 2009; Menezes et al., 2009) e na degradação de poluentes ambientais (Leahy e Colwell, 1990; Jackson & Pardue, 1999).

## **2. Enzimas ligninolíticas**

As enzimas extracelulares são importantes para o desenvolvimento dos fungos em seu habitat natural, entre elas as celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases fornecem aos fungos os meios para obtenção de energia e nutrientes, além de contribuir para a ação de fungos patogênicos a células vegetais e animais (Aro et al., 2005).

Entre as enzimas extracelulares produzidas por fungos, as ligninolíticas são de grande importância na valorização de resíduos vegetais, juntamente com outras aplicações industriais e ambientais. As enzimas ligninolíticas são enzimas capazes de degradar a lignina presente em todas as plantas vasculares.

A lignina é um polímero amorfo complexo composto de unidades fenil propano (C9) unidas por diferentes tipos de ligações e suas estruturas podem variar entre as espécies vegetais (Fengel e Wegener, 1984). Constituindo de 20-30% da parede celular vegetal é o polímero natural mais abundante no planeta, depois da celulose, e também rico em anéis aromáticos (Leonowicz et al., 1999). Este polímero confere rigidez à parede celular e aos tecidos das plantas vasculares e está envolvido no transporte de água em plantas superiores, além de formar uma barreira contra o ataque microbiano (Hofrichter, 2002).

Os fungos envolvidos na degradação da fração de lignina secretam diferentes enzimas extracelulares, como as ligninolíticas, catalisando reações que levam a degradação do polímero. Levando-se em consideração a complexidade da molécula da lignina, as enzimas capazes de degradar este polímero são amplamente estudadas na degradação de diversos compostos formados por estruturas complexas (aromáticas), como por exemplo, os HPAs.

As enzimas ligninolíticas são produzidas durante o metabolismo secundário e atuam na oxidação dos substratos em ambientes externos às células (Hofrichter, 2002). São três as principais enzimas diretamente envolvidas na degradação da lignina: manganês- peroxidase



(MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacase (Lac), suas principais características são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais características das enzimas ligninolíticas

	<b>MnP</b>	<b>LiP</b>	<b>Lacase</b>
<b>Grupo Prostético</b>	Heme	Heme	-
<b>Sítio Ativo</b>	-	-	Cobre
<b>Massa Molecular (KDa)</b>	32-62,5	38-47	59-110
<b>pH ótimo</b>	2,6-4,5	3,2-4,7	2,6-4,5
<b>PI</b>	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
<b>Cliva ligação carbono-carbono</b>	Sim	Sim	Não
<b>Necessita de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Sim	Sim	Não
<b>Especificidade</b>	Restrita	Ampla	Ampla

### 2.1 Lignina Peroxidase (LiP, E.C:1.11.1.14)

A LiP foi a primeira enzima estudada quanto à capacidade de atacar compostos de lignina (Tien e Kirk, 1984), sendo a principal responsável na degradação de compostos não fenólicos da molécula. A LiP contém um grupo prostético heme e sua ação depende da presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O intermediário oxidado retira um elétron de núcleos aromáticos formando radical aril, que se decompõem espontaneamente via reações de caráter iônico e radicalar. Contudo, o peróxido de hidrogênio em excesso pode inativar a enzima (Kirk e Farrel, 1987).

Um dos substratos redutores de maior preferência pela LiP é o álcool veratrílico (3,4-dimetoxi-álcool), um metabólito secundário de fungos, que é oxidado a veratraldeído na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kirk e Farrel, 1987). Alguns estudos têm demonstrado que o álcool veratrílico pode agir como redutor da LiP e na proteção da inativação causada pelo peróxido de hidrogênio, pois impede que a enzima passe a um estado de oxidação e seja inativada (Gutiérrez, 1995).

Entre as enzimas ligninolíticas, a LiP é a que apresenta o maior potencial redox (Caramelo et al., 1999). Entretanto, nem todos os fungos ligninolíticos são capazes de produzir esta enzima. Porém, genes que codificam isoenzimas de lignina peroxidase foram encontrados em fungos, em cujos meios de cultivo não foi encontrada a enzima, sugerindo que a expressão de LiP, em alguns fungos de decomposição branca, como para *Phanerochaete chrysosporium* a atividade de LiP está relacionada com o método de cultivo utilizado ou com a presença de indutores específicos (Reddy et al., 1993; Dittmer et al., 1997).

## **2.2 Manganês Peroxidase (MnP, E.C:1.11.1.13)**

A manganês dependente do peróxido de hidrogênio ou manganês peroxidase (MnP) foi descoberta em 1984 por Kuwahara e colaboradores. É uma glicoproteína dependente de  $H_2O_2$  para sua atividade, formada por um heme Fe-protoporfirínico IX como grupo prostético. Esta enzima requer o íon  $Mn^{2+}$  que é oxidado a  $Mn^{3+}$ , que por sua vez, oxida substratos orgânicos como fenóis e radicais fenoxil (Kuwahara et al., 1984).

A MnP participa de reações de despolimerização de ligninas e degradação de cloroligninas e atuam também como mediador na etapa inicial da degradação de ligninas de alta massa molecular (Kirk e Farrell 1987; Hofrichter, 2002; Martínez et al., 2005).

Alguns trabalhos mostram que há uma co-operação de MnP com outras enzimas ligninolíticas, como MnP e lacase, e MnP e LiP, resultando na ampliação da despolimerização da lignina (Hofrichter et al., 2001). Alguns autores evidenciam a ação conjunta de MnP e lacase relacionadas à degradação. Em um estudo de biorremediação reportado por Novotný et al., (2004), os altos níveis dessas duas enzimas foram relacionados às maiores taxas de degradação de HPAs.

### **2.3 Lacase (Lac, E.C:1.10.3.2)**

A lacase foi descoberta por Yoshida em plantas em 1983 e alguns anos depois em fungos, por Call e Mucke (1997). Esta enzima foi nomeada como lacase cerca de 10 anos mais tarde, após o seu isolamento e purificação (Mayer e Staples, 2002). Os estudos com lacase iniciaram em meados dos anos setenta e, atualmente, inúmeras revisões estão disponíveis na literatura (Claus, 2004; Giardina et al., 2009; Rodgers et al., 2009).

As lacases são oxidases multi-cobre, ou seja, uma glicoproteína que contém cobre em seu sítio ativo, não requer  $H_2O_2$  para sua atividade e que catalisa a redução de  $O_2$  para  $H_2O$ . Em geral, a lacase apresenta 4 átomos de cobre, os quais são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos: cobre tipo 1, 2 e 3, diferenciados por propriedades específicas e contendo importante papel no mecanismo catalítico da enzima (Hoegger et al., 2006).

Estas enzimas podem oxidar diferentes compostos como: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, difenilmetanos, benzopirenos, organofósforos e outros compostos fenólicos similares à lignina, ou seja, em contraste com a elevada especificidade de algumas enzimas, as lacases são bastante inespecíficas. A lacase teve seu papel ampliado quando foi verificada sua capacidade de degradar também subestruturas não fenólicas da lignina na presença de compostos mediadores, como espécies fenólicas presentes no ambiente natural (Bourbonnais e Paice, 1996; Eggert et al., 1996). Em geral, um mediador pode ser definido como uma molécula com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos. Depois de oxidado pela enzima, o mediador sai de seu sítio ativo e pode oxidar qualquer substrato, que, devido ao seu tamanho, não consegue entrar diretamente no sítio enzimático. A forma oxidada do mediador é distinta estruturalmente da enzima oxidada, o que lhe permite diferentes mecanismos de oxidação e, conseqüentemente aumenta a gama de substratos suscetíveis a ação da enzima (Baiocco et al., 2003). Esses mediadores naturais podem ser metais ou

fragmentos da lignina gerados pela ação de outras enzimas ligninolíticas. Substâncias como ácidos fenólicos também são propostos como mediadores naturais (Durán e Esposito, 2000; Novotný et al., 2000; D'Acunzo e Galli, 2003; Claus 2004; Baldrian, 2006). Como exemplo de mediadores tem-se o ABTS-2,2 -Azinobis(3- etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico), que pode atuar como substrato e/ou mediador da lacase, e ainda o álcool veratrílico (Durán e Esposito, 2000).

Dentre as diversas funções ecológicas, a lacase pode proteger o patógeno fúngico de fito-toxinas e taninos do hospedeiro (Brasier e Kirk, 2001), pode ter ação desintoxicante, protegendo o fungo de metabólitos tóxicos (Schouten et al., 2002) e pode ainda reduzir a atividade de lignificação do hospedeiro (Van Etten et al., 1994).

#### 2.4 Fungos produtores de enzimas ligninolíticas

Os fungos produtores de enzimas ligninolíticas, capazes de degradar a lignina, são conhecidos como fungos que degradam madeira. São divididos em três categorias principais (tabela 2), definidas de acordo com o modo de ataque à molécula da lignina durante o processo de degradação (Arora e Sharma, 2009).

**Tabela 2.** Classificação dos fungos degradadores de lignina (Tuomela et al., 2000)

Organismo	Filo	Degradação da Lignina	Ambiente	Exemplo de alguns gêneros
<b>Podridão branca</b>	Basidiomycota e Ascomycota	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva	Madeira dura	<i>Phanerochaete</i> <i>Phlebia</i> <i>Trametes</i>
<b>Podridão parda</b>	Basidiomycota	Modificação da lignina	Madeira Mole	<i>Poria</i> <i>Polyporus</i>
<b>Podridão mole</b>	Ascomycota ou fungos anamórficos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada	<i>Paecilomyces</i>

A maioria dos fungos de podridão mole (*soft-rot fungi*) pertence ao filo Ascomycota e receberam essa denominação por produzirem um amolecimento nas camadas superficiais da parede da célula vegetal, resultando em perda de resistência do tecido. Estes fungos degradam a madeira através da formação de cavidades microscópicas no interior da parede celular secundária (Blanchette et al., 2004). Neste tipo de degradação ocorre somente uma baixa taxa de degradação de polissacarídeos e uma degradação limitada da lignina (Kirk e Farrel, 1987).

Os fungos de podridão parda (*brown-rot fungi*) pertencem ao filo Basidiomycota e modificam a estrutura da lignina (Crowling, 1961). São fungos que preferencialmente degradam a celulose e hemicelulose (Highley e Illman, 1991). Esta decomposição pode resultar em um pó marrom que consiste principalmente da lignina liberada enzimaticamente (Arora e Sharma, 2009).

Os fungos de podridão branca (*white-rot fungi*) pertencem aos filos Basidiomycota e Ascomycota, e apresentam uma alta capacidade para degradar todos os componentes da madeira, inclusive a lignina (Ander e Eriksson, 1977), por meio da produção de enzimas e/ou compostos não enzimáticos (Eriksson et al., 1990). Os fungos de degradação branca são os degradadores mais eficientes, transformando a lignina em um material fibroso branco. Estes são os únicos organismos conhecidos capazes de mineralizar completamente a lignina em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, porém não são capazes de utilizar a lignina como única fonte de carbono e energia (Boyley et al., 1992).

É importante destacar que o sistema ligninolítico dos fungos, principalmente dos fungos de degradação branca, não é homogêneo. Diferentes fungos têm mostrado capacidade para produzir uma ou mais enzimas ligninolíticas (Arora e Sharma, 2009).

#### **2.4.1 Produção de enzimas ligninolíticas por fungos derivados de ambientes marinhos**

Diferentes grupos taxonômicos de fungos foram reportados como produtores de enzimas do sistema ligninolítico (Cullen, 1997; Raghukumar et al., 1999; Gianfreda e Rao, 2004; Dhouib et al., 2005; Kellner et al., 2007; Lopez et al., 2007). Entretanto, os mais conhecidos são os basidiomicetos devido à eficiência na produção de LiP, MnP e lacases. De acordo com Tuomela et al. (2000), são poucas as informações sobre a produção de enzimas ligninolíticas por outros grupos taxonômicos de fungos como, por exemplo, os ascomicetos considerados fungos de podridão mole por atacarem a lignina em estado avançado de umidade, presente principalmente em ambientes aquáticos.

Alguns fungos derivados de ambiente marinho foram reportados na literatura como produtores de enzimas ligninolíticas. D'Souza et al. (2006) atribui a produção de uma quantidade elevada de lacase por um fungo basidiomiceto marinho não identificado. No estudo de Raghukumar et al., (1994) foram alcançados resultados positivos para a produção de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e lacase) pelo fungo de degradação branca *Flavodon flavus*, isolado dos detritos da alga *Thalassia hemprichii*. No ambiente marinho, as enzimas ligninolíticas possivelmente fornecem meios para a obtenção de energia e nutrientes, além da proteção a possíveis patógenos (Aro et al., 2005).

As pesquisas com fungos derivados de ambiente marinho, em sua maioria, se referem aos experimentos de descoloração de efluentes coloridos e corantes sintéticos, sendo a avaliação da produção de enzimas ligninolíticas um objetivo secundário (Raghukumar et al., 2008). Em adição, nestas investigações científicas, a lacase e a MnP são as enzimas mais estudadas, sendo poucas as informações sobre a atividade de LiP por fungos derivados marinhos.

## **2.5 Aplicação biotecnológica das enzimas ligninolíticas**

As enzimas ligninolíticas não possuem alta especificidade com os substratos, visto que a estrutura da lignina apresenta diversos modelos. Portanto, essas enzimas possuem um papel de destaque nos tratamentos enzimáticos nas diferentes indústrias, como as indústrias alimentícias e de papel e celulose, e na remediação de diversos compostos poluentes. Basicamente, todas as aplicações destas enzimas, podem estar relacionadas com a propriedade de cada enzima, que é a habilidade de produzir um radical livre a partir de um substrato adequado.

A deslignificação de materiais lignocelulolíticos é uma das importantes aplicações das enzimas ligninolíticas, entretanto, seu conhecimento é pouco difundido. A separação da lignina a partir de fibras de celulose é um passo importante na transformação da madeira para a fabricação da pasta de celulose. Os métodos convencionais como a utilização de cloro, podem promover diversos problemas ambientais, como por exemplo a geração de compostos clorados e cloro-ligninas. Tais compostos são extremamente tóxicos ao meio ambiente, além de tornar a água dos rios e lagos amarronzadas. Para superar este fato a deslignificação através de sistemas enzimáticos ligninolíticos é uma alternativa para o tratamento de matérias ligninolíticas. Esta deslignificação é também aplicada no tratamento de forragem utilizada na alimentação de ruminantes, pois a lignina afeta a digestibilidade da fibra e este tratamento, além de melhorar a digestibilidade, aumenta o valor nutricional do produto (Arora e Sharma, 2009).

Na geração de combustíveis por meio das hidrólases química e física de materiais lignocelulolíticos, compostos derivados de furanos, como furfural e hidroxi-metil-furfurol presentes nestes processos podem inibir a fermentação microbiana, diminuindo o rendimento final. Neste sentido, a lacase purificada tem sido utilizada para tal deslignificação, resultando em uma melhor produtividade (El-Nasser et al., 1997; Arora e Sharma, 2009).

Do ponto de vista alimentício, a presença de compostos fenólicos em mostos e vinhos, após modificações durante o tempo de prateleira pode provocar o surgimento de alguns problemas, como a descoloração e alteração no sabor. Entretanto, segundo a legislação, aditivos não podem ser adicionados a estes produtos. Neste sentido, a utilização de lacases imobilizadas pode ser uma estratégia interessante para a estabilização destas bebidas contra a descoloração e turvação. Assim, a lacase pode ser aplicada na preparação de mosto e vinho e na estabilização de suco de frutas (Arora e Sharma, 2009).

No tratamento de poluentes ambientais e compostos tóxicos, as enzimas ligninolíticas têm sido extensivamente estudadas. Resumidamente, diferentes LiPs mostraram capacidade de mineralizar vários compostos aromáticos recalcitrantes, de oxidar numerosos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos fenólicos (Durán e Esposito, 2000), bifenilas policloradas e diversos corantes (Wesenberg et al., 2003). As MnPs de fungos causadores da podridão branca vêm sendo empregadas em estudos de biodegradação da lignina (Hilden et al., 2000), HPAs, corantes sintéticos (Heinfling et al., 1998) e poluentes clorados (Haas et al., 2004). As lacases, tanto na forma livre como imobilizada ou em solventes orgânicos, têm sido aplicadas em diferentes processos, incluindo a degradação de corantes têxteis, compostos fenólicos, HPAs, entre outros poluentes ambientais (Majeau et al., 2009).

As indústrias de papel e celulose liberam grandes volumes de efluentes intensamente coloridos, os quais contêm clorados tóxicos. Diversos fungos de podridão branca capazes produzir LiP mostraram envolvimento na descoloração de efluente negro da indústria de papel e celulose (Thompson et al., 2001; Wu et al., 2005). Estudos com os fungos marinhos *Sordaria fimicola* e *Halosarpheia ratnagiriensis* demonstraram a produção de MnP e lacase na descoloração de cerca de 65-75% de um efluente industrial (black liquor) em 8 dias (Raghukumar et al., 1996).



O efluente da lavagem de subprodutos de usinas e destilarias de álcool, como melaço, contém compostos recalcitrantes de cor marrom escura, muitos dos quais são tóxicos para uma série de micro-organismos. A capacidade de remoção da coloração foi demonstrada por vários fungos de podridão branca e também por alguns fungos marinhos, conforme descrito por Raghukumar et al. (2008), com destaque quanto ao envolvimento das enzimas ligninolíticas no processo.

Alguns estudos (Wong e Yu 1999; Peralta-Zamora et al., 2003) sobre a descoloração de corantes sintéticos e de corantes em águas residuárias utilizando enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca têm sido reportados. Os trabalhos de Raghukumar et al., (1999 e 2002) e D'Souza et al., (2006) mostraram resultados significativos na descoloração de efluentes têxtil e corantes sintéticos como vermelho congo, verde brilhante e RBBR, onde alguns foram totalmente descoloridos por fungos marinhos.

A degradação de HPAs, compostos formados durante a combustão de combustíveis fósseis e considerados um dos principais poluentes ambientais, vem sendo extensivamente estudada em fungos terrestres (Cerniglia, 1992; Potin et al., 2004; Sutherland, 1992). O metabolismo dos HPAs originários de diversas fontes (incluindo os que ocorrem em derramamentos acidentais de petróleo) por fungos é mediado pelo citocromo P-450 monooxigenase (fungos não-ligninolíticos), podendo envolver também enzimas extracelulares do sistema ligninolítico incluindo a LiP, MnP e lacase (fungos ligninolíticos) (Hamman, 2004; Steffen et al., 2007). Entretanto, o mecanismo básico envolvido nos processos de biorremediação dos HPAs permanece ainda pouco entendido (Verdin et al., 2006). De acordo com da Silva et al. (2003), Baborová et al. (2006) e Chulalaksananukul et al. (2006), o sistema ligninolítico é de grande importância na degradação de HPAs, servindo como uma estratégia fundamental na biorremediação de ambientes contaminados (Korda et al., 1997).

A biodegradação de HPAs provenientes de derramamento de petróleo e seus derivados nos oceanos por meio da utilização de micro-organismos derivados de ambiente marinho pode ser considerada estrategicamente interessante, principalmente pelo fato da degradação destes poluentes no ambiente marinho ser limitada em função dos nutrientes e salinidade (Leahy & Colwell, 1990). Poucos são os trabalhos relacionados à degradação de HPAs com fungos derivados de ambientes marinhos. Os trabalhos de da Silva et al. (2008) e Passarini (2008) relatam a capacidade de fungos filamentosos não-ligninolíticos isolados de cnidários marinhos para descolorir o corante RBBR e degradar HPAs de alto peso molecular. Em adição, a remoção do HPA fenantreno por um fungo marinho ligninolítico foi relatada por Raghukumar et al. (2006).

Os resultados obtidos nos estudos acima citados salientam o potencial dos fungos derivados de ambiente marinho para aplicações industriais e na biorremediação de áreas contaminadas por poluentes ambientais. De acordo com Raghukumar (2002), uma gama de efluentes industriais possui pH alcalino e grandes quantidades de íons sódio e, portanto, os fungos derivados de amostras marinhas parecem ideais para o tratamento destes efluentes. No Brasil, até o momento, nenhuma informação é conhecida sobre o potencial dos fungos derivados marinhos na descoloração/degradação de corantes e efluentes têxteis.

## **2.6 Estudo de genes envolvidos na atividade ligninolítica**

O conhecimento e a determinação do gene ou genes potencialmente envolvidos na atividade enzimática extracelular é de extrema importância para o avanço nos estudos de evolução e funcionalidade das enzimas. O basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* surgiu como um modelo para o desenvolvimento de estudos moleculares referentes às enzimas ligninolíticas.

Sabe-se que as LiPs de *P. chrysosporium* são codificadas por uma família de pelo menos dez genes estruturalmente relacionados, descritos como *lipA* a *lipJ* (Gaskell et al., 1994), cujas sequências são altamente conservadas (Cullen, 1997). Os níveis de transcrição dos genes *lip* podem ser fortemente modulados pelas condições de cultivo e também variar dependendo da linhagem estudada (Cullen, 1997). Holzbaur e Tien (1988) examinaram os níveis de transcrição dos genes que codificam as isoenzimas H8 (*lipA*) e H2 (*lipD*) do fungo *P. chrysosporium* e em condições de escassez de nitrogênio, os transcritos de *lipA* foram muito abundantes, enquanto que a expressão de *lipD* foi relativamente baixa.

Assim como as LiPs as MnPs são codificadas por múltiplos genes. Contudo, pouco se conhece a respeito do número e da estrutura dos genes da MnP. Segundo Cullen (1997), mesmo para as espécies com sequências já descritas (*P. chrysosporium* e *Trametes versicolor*) o número total de genes da MnP presentes em cada linhagem ainda não foi definido.

Os estudos sobre a diversidade de genes da lacase estão bem difundidos entre diversos grupos de fungos ligninolíticos e não-ligninolíticos (D'Souza et al., 1996; Lyons et al., 2003; Tetsch et al., 2005; Aneja et al., 2006; Kellner et al., 2007). Estes estudos abordam, principalmente, a estrutura dos genes, bem como os mecanismos que regulam a expressão destes genes, e são extremamente importantes para a elucidação dos papéis das diferentes lacases (Temp et al., 1999), uma vez que lacases são secretadas por múltiplas isoenzimas (Arora e Sharma, 2009). Diversos trabalhos citados por Arora e Sharma (2009) mostram que os fungos são capazes de produzir diferentes lacases e a proporção das enzimas produzidas depende da composição e das condições de cultivo, característica que parece ser difundida entre as outras enzimas ligninolíticas.

Estudos recentes buscam respostas sobre a estrutura e evolução da diversidade de lacases de fungos, como os trabalhos de Valderrama et al. (2003) e de Hoegger et al., (2006). Em seu estudo, Hoegger et al. (2006) analisaram 90 sequências gênicas de lacases de

basidiomicetos e ascomicetos, que resultaram na formação de dois grupos (*clusters*), contendo separadamente basidiomicetos e ascomicetos. O arranjo das seqüências dos basidiomicetos sugere que a enzima é típica de espécies fúngicas de decomposição da madeira, variando de acordo com a função e as características bioquímicas de cada enzima.

Exoenzimas ligninolíticas de fungos são objetos de estudos da engenharia genética. Genes de lacase de fungos filamentosos foram expressos com sucesso em diferentes micro-organismos, visando o aumento da produção da enzima, atividade em diferentes condições e eficientes aplicações biotecnológicas (Cherry et al., 1999; Limura et al., 2002; Mander et al., 2006; Majeau et al., 2009).

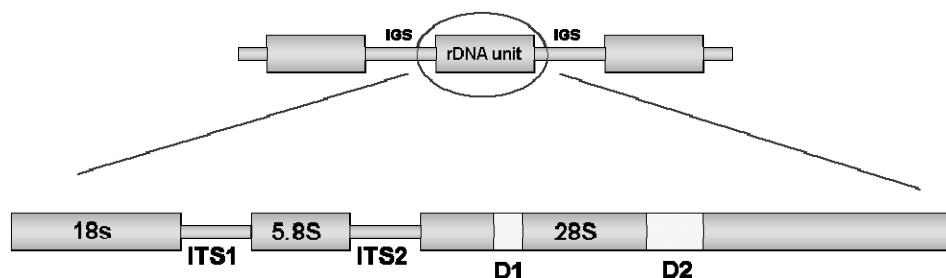
### **3. Taxonomia de Fungos Filamentosos**

Nos estudos de aplicações biotecnológicas de produtos naturais bioativos, incluindo as enzimas produzidas por micro-organismos, é de fundamental importância que a identificação e preservação dos organismos isolados sejam realizadas de maneira apropriada, pois sem estas condições, as investigações tornam-se difíceis e impossíveis de serem reproduzidas (Bugni e Ireland, 2004). No caso da utilização de isolados microbianos em processos de biorremediação a correta caracterização taxonômica pode evitar problemas associados à utilização e liberação no ambiente de potenciais patógenos de plantas e animais (Sette et al., 2005).

Os sistemas de classificação de fungos filamentosos são principalmente baseados na observação macro e microscópica das características morfológicas de suas estruturas reprodutivas. Entretanto, muitas limitações são encontradas, pois em muitos casos estas estruturas não são formadas (Guarro et al., 1999).

Embora os dados morfológicos possuam um papel de grande importância na taxonomia de fungos filamentosos, o uso adicional de dados moleculares tem se tornado cada vez mais comum. As informações derivadas de ácidos nucleicos apresentam alta sensibilidade e

especificidade e podem ser empregadas na classificação de linhagens microbianas em diversos níveis taxonômicos hierárquicos, desde o estabelecimento de relações infra-específicas até supra-genéricas (Stackebrandt e Liesack, 1993).



**Figura 1.** Esquema representativo do *operon* ribossomal dos fungos.

Um dos marcadores moleculares mais utilizado na identificação e diferenciação de espécies é o DNA ribossomal (DNAr). Os DNAr nos eucariotos estão presentes repetidas vezes e cada unidade consiste de regiões codificadoras para os genes RNAr 18S, 5,8S e 28S, e dois espaçadores internos, ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) que separam essas regiões. Cada unidade de DNAr é separada por um espaço intergênico IGS (*Intergenic Spacer*) (Burton et al., 2005) (Figura 1).

Guarro et al. (1999) relataram várias revisões sobre o uso de técnicas moleculares na sistemática de fungos. Segundo os autores, a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é a mais promissora, sendo o DNAr o mais utilizado por estar presente em todos os organismos. As informações contidas nestas moléculas têm sido extensivamente utilizadas em estudos de diversidade e caracterização de comunidades (Abel et al., 2006; De Bellis e Widden, 2006; James et al., 2006; Wang et al., 2008), identificação e detecção (Abarca et al., 2004; Abel et al., 2006; Wang et al., 2008), tipagem (Mummey e Rillig, 2007; Sutar et al., 2004) e inferência das relações filogenéticas (Larsson, 2007; Takamatsu et al., 2006).

Os genes que codificam para a formação do RNA ribossomal 18S e 28S são muito conservados e podem ser utilizados para diferenciação em nível de gênero e espécies (Burton

et al., 2005; Yli-Matilla et al., 2004). Por outro lado, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam uma maior variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies e/ou entre linhagens da mesma espécie (Burton et al., 2005; Abel et al., 2006; Yli-Matilla et al., 2004). A subunidade maior do DNA ribossomal dos eucariotos (LSU rDNA) compreende os domínios D1/D2 (Figura 1), relatados como úteis para a identificação da maioria dos fungos filamentosos do grupo dos ascomicetos e zigomicetos (Guarro et al., 1999; O'Donnell et al., 2001). Em adição, outros genes podem ser utilizados para a taxonomia de fungos, especialmente genes que codificam proteínas com funções básicas estruturais, que apresentam regiões altamente conservadas e funcionais, como genes para  $\beta$ -tubulina que está recebendo uma atenção crescente em estudos filogenéticos para uma ampla gama de organismos, principalmente do gênero *Fusarium* (Einaxa e Voigt, 2003).

A técnica de polimorfismo genético "*fingerprinting*" tem sido amplamente adotada para diferenciar organismos ao nível de espécies e subespécies (Maclean et al., 1993). Os padrões em géis de eletroforese dos fragmentos gerados para um isolado pode ser usado como um "*fingerprint*" para determinação da diversidade. A análise de polimorfismo genético de DNAr (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – ARDRA*) faz uso de endonucleases de restrição para clivar os fragmentos amplificados em sítios específicos, originando um padrão de dois ou mais fragmentos que poderão inferir mais especificamente na variabilidade entre isolados (Jorgensen e Cluster, 1989). Essa técnica apresenta vantagens como rapidez em tempo e o não requerimento de informação de sequência (Williams et al., 1990). A técnica de ARDRA pode ser bastante útil para uma rápida análise da diversidade de uma amostra ambiental. Menezes et al. (2009) investigaram a diversidade de bactérias e fungos isolados de nove diferentes macro-organismos marinhos. Dados provenientes do ARDRA revelaram 144 ribotipos distintos de 256 isolados de fungos e 158 ribotipos distintos de 181 isolados bacterianos, os quais foram selecionados para o seqüenciamento do DNAr. Neste estudo, a

aplicação do método de ARDRA, associada ao sequenciamento dos diferentes ribotipos obtidos, permitiu o conhecimento da diversidade de micro-organismos associados às amostras de alga e invertebrados marinhos estudadas.

## Referências

- Abarca, M.L., Accensi, F.C.J, Cabañes, F.J. Taxonomy and significance of black aspergillus9. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86: 33-49, 2004.
- Abel, A., Oda, Y., Asano, K., Sone, T. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 70: 2387-2393, 2006.
- Amagata, T.; Morinata, B. I.; Amagata, A.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Lobkovsky, E.; Clardy, J.; Crews, P. A Chemical Study of Cyclic Depsipeptides Produced by a Sponge-Derived Fungus. *Journal of Natural Products*. 69: 560-1565, 2006.
- Ander. P., Eriksson, K., E. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiol Plant*. 41: 239-248, 1977.
- Aneja, M.K., Sharma, S., Fleischmann, F., Stich, S., Heller, W., Bahnweg, G., Munch, J.C., Schloter, M. Microbial colonization of beech and spruce litter–influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microbiol Ecology*. 52: 127–135, 2006.
- Aro, N., Pakula, T., Penttila, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 719–739, 2005.
- Arora, D.S., Sharma, R.K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. In press: DOI 10.1007/s12010-009-8676-y.
- Baborová, P., Möder, M., Baldrian, P., Cajthamlová, K., Cajthaml, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*. 157: 248-253, 2006.
- Baiocco, P., Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 1: 191 197, 2003.



- Baker, P.W., Kennedy, J., Dobson, A.D.W., Marchesi, J.R. Phylogenetic Diversity and Antimicrobial Activities of Fungi Associated with *Haliclona simulans* Isolated from Irish Coastal Waters. *Marine Biotechnology*. 11:540–547, 2009.
- Baldrian, P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters*. 30: 215-242, 2006.
- Berlinck, R.G.S., Hajdu, E., Rocha, R.M., Oliveira, J.H.H.L., Hernández, I.L.C., Selegim, M.H.R., Granato, A.C., Almeida, E.R.V.R., Nuñez, C.V., Muricy, G., Peixinho, S., Pessoa, C., Moraes, M.O., Cavalcanti, B.C., Nascimento, G.G.F., Thiemann, O., Silva, M., Souza, A.O., Silva, C.L., Minarini, P.R.R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products*. 67: 2004.
- Blanchette, R. A., Held, B. W., Jurgens, J. A., Mcnew, D. L., Harrington, T. C., Duncan, S. M., Farrell, R.L. Wood destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1328–1335, 2004.
- Bonugli-Santos, R.C.; Durrant, L.R.; da Silva, M.; Sette, L.D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 32-37, 2010.
- Boyley, C. D., Kropp, B. R., Reid, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3217–3224, 1992.
- Boot, C.M., Tenney, K., Valeriote, F.A., Crews, P. Highly *N*-Methylated Linear Peptides Produced by an Atypical Sponge-Derived *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*. 69: 83-92, 2006.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G. Enzymatic deslignification of kraft pulp using lacase and a mediator. *Tappi Journal*. 79: 199-204, 1996.
- Brasier, C.M., Kirk, S.A. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research*. 105:547-554, 2001.

- Bugni, T.S., Ireland, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*. 21: 143 - 163, 2004.
- Burton, R.S., Netz, E. C., Flowers, J. M., Willett, C. S. Unusual structure of ribosomal DNA in the copepod *Trigriopus californicus*: intergenic spacer sequences lack internal subrepeats. *Gene*. 344: 105-113. 2005.
- Call, H.P., Mucke, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *Journal of Biotechnology*. 53:163–202, 1997.
- Caramelo, L., Martinez, M.J., Martinez, A.T. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma- thiomethylbutyric acid and lignin model dimmers. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 916–22, 1999.
- Cerniglia, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3: 351-368, 1992.
- Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., Pedersen, A. H. Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*. 17: 379-384, 1999.
- Chulalaksananukul, S., Gadd, G.M., Sangvanich, P., Sihanonth, P., Piapukiew, J., vangnai, A. S. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS Microbiology Letters*. 262: 1-99, 2006.
- Claus, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96, 2004.
- Crowling E.B. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by whiterot and brown-rot fungi. Tech Bull 1258. *USDA Washington, DC*, p.79., 1961.
- Cullen, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Jornal of Biotechnology*. 53: 273-289, 1997.

- D'Acunzo, F., Galli, C. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3634-3640, 2003.
- D'Souza, T.M. Boominathan, K. & Reddy, C.A. Isolation of Laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3739–3744, 1996.
- D'Souza, D.T., Tiwari, R., Sah, A.K., Raghukumara, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 504–511, 2006.
- De Bellis, T., Widd, E, P. Diversity of the small subunit ribosomal RNA gene of the arbuscular mycorrhizal fungi colonizing *Clintonia borealis* from a mixed-wood boreal forest. *FEMS Microbiology Ecology*. 58: 225-235, 2006.
- Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W, Dhawale, S.S. Production of multiple laccase isoforms by *P. chrysosporium* grow under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*. 149: 65-70, 1997.
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez, M.J., Sayadi, S. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 21:1415 -1423, 2005.
- Durán, N., Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B Environmental*. 714: 1-17, 2000.
- Eggert, C., Temp. U., Dean, J.F.D., Elksson, K-EL. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*. 391: 144-148, 1996.

- Einaxa, E., Voigt K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution*. 3: 185-194, 2003.
- El-Nasser, N.H.A., Helmy, S. M.; EL-Gammal, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. *Polymer Degradation and Stability*. 55: 249-253, 1997.
- Eriksson K.-E.L., Blachette R.A., Ander P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components, Springer Verlag, Heidelberg, 407p, 1990.
- Fengel, D., Wegener G. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions Dietrich Fengel: Gerd Wegener- Berlin, 1984
- Gaskell, J., Stewart, P., Kersten, P., Covert S., Reiser, J., Cullen, D. Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: Application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology*, 12: 1372-1375, 1994.
- Gianfreda, L., Rao, M.A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 35: 339–354, 2004.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*. In Press: DOI 10.1007/s00018-009-0169-1.
- Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 454–500, 1999.
- Gutiérrez, A. Exopolissacarídios y metabolitos aromáticos de *Pleurotus*: Naturaleza y función en la degradación de la lignina. Tese de doutorado, Universidade de Sevilha, Sevilha 1213, 1995.
- Haas, R., Tsivunchyk, O., Steinbach, K., Löw, E.V., Scheibner K., Hofrichter, M. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 564–566, 2004.

- Hamman, S. Bioremediation capabilities of white rot fungi. Review. Article Spring, p. 12, 2004.
- Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2788–2793, 1998.
- Highley, T. L., Illman, B. L. Progress in understanding how brown-rot fungi degrade cellulose. *Biodeterioration Abstracts*. 5: 231–244, 1991.
- Hilden, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P., Heriksson, G. Do the extracellular enzyme cellobiose dehydrogenase form a pathway in lignin biodegradation? *Federation of European Biochemical Societies*. 477: 78-83, 2000.
- Hill, R.A. Marine natural products. *Annual Reports on the Progress of Chemistry*. 101: 124–136, 2005.
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kues, U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal*. 273: 2308–2326, 2006.
- Hofrichter, M., Lundell, T., Hatakka, A. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (10): 4588-4593, 2001.
- Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidases (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466, 2002.
- Holzbaumer, E., Tien, M. Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 155: 626–633, 1988.

- Hyde, K.D., SArma, V.V., Jones, E.B.G. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: Marine Mycology- A Practical Approach (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing). *Fungal Diversity Research Series*. 1: 172-204, 2000.
- Jackson, A., Pardue, J.H. The Role of Nutrient Additions on Crude Oil Degradation in Louisiana's Salt Marshes. *Water Soil Air Pollut.* 109: 343 - 355, 1999.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, R., Reeb, V., Arnold, A. E., Amtoft, A., Stajich, S. J. E., Hosaka, K., Sung, G., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J. M., Slot, J. C., Wang, Z., Wilson, A. W., Schubler, A., Longcore, J. E., O'Donnell, K., Standridge, S. M., Porter, D., Letcher, P. M., Powell, M. J., Taylor, J. W., White, M. M., Griffith, G. W., Davies, D. R., Humber, R. A., Morton, J. B., Sugiyama, J., Rossman, A. Y., Rogers, J. D., Pfister, D. H., Hensen, K., Hamblenton, S., Shoemaker, R. A., Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, V. B., Spotts, R. A., Serdani, M., Crous, P. W., Hughes, K. W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W. A., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D. M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, I., Yahr, R., Hibbetts, D. S., Lutzoni, F., McLaughlin, D. J., Spatafora, J. W., Vilgalys, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443: 818-822, 2006.
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annual Missouri Botanical Garden*. 75:1238-1247. 1989.
- Karl, D.M. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nature reviews Microbiology*. 5: 759-769, 2007.

- Kellner, H., Luis, P., Buscot, F. Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiology Ecology*. 61: 153–163, 2007.
- Kirk, T.K., Farrel, R.L. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. 41: 465-505, 1987.
- Kobayashi, H., Namikoshi, M., Yoshimoto, T., Yokochi, T. A screening method for antimetabolic and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*, modification and application to tropical marine fungi. *Journal of Antibiotics*. 49: 873-879, 1996.
- Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine Micology: The Higher Fungi. Academic Press, New York, 1979.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., Santas, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 677–686, 1997.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 169: 247-250, 1984.
- Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F., Hansen, M.E., Frisvad, J.C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*. 22: 672 – 695, 2005.
- Larsson, K. H. Molecular phylogeny of *Hyphoderma* and the reinstatement of *Peniophorella*. *Mycological Research*. 111: 186-195, 2007.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*. 54(3): 1990.

- Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J.K., Culley, de, Collett, Jr, Martin, J., Druzhinina, I.S., Mathis, H., Monot, F., Seiboth, B., Cherry, B., Rey, M., Berka, R., Kubicek, C.P., Baker, S.E., Margeo, T.A. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106: 16151-16156, 2009.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A. Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas Wasilewska, M, Cho, N., Hofrichter, M. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 175-185, 1999.
- Li, Y., Li, X., Kim, S. K., Kang, J. S., Choi, H. D., Rho, J. R., Son, B. W. Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 52: 375-376, 2004.
- Limura, Y., Ikeda, S., Sonoki, T., Hayakawa, T., Kajita, S., Kimbara, K., Tatsumi, K., Katayama, Y. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Applied Microbiological Biotechnology*. 59: 246-251, 2002.
- Liu, R., Gu, Q., Zhu, W., Cui, C., Fan, G., Fang, Y., Zhu, T., Liu, H. 10-Phenyl-[12]-cytochalasins Z<sub>7</sub>, Z<sub>8</sub>, and Z<sub>9</sub> from the Marine-Derived Fungus *Spicaria elegans*. *Journal of Natural Products*. 69: 871-875, 2006.
- Lopez, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 794–800, 2007.
- Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A., Moran, M.A. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a Southeastern US salt marsh. *Microbial Ecology*. 45: 270–281, 2003.



- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*. In press: doi10.1016/j.biortech.2009.10.087.
- Mander, G. J., Wang, H., Bodie, E., Wagner, J., Vlenken, K., Vinuesa, C., Foster, C., Leeder, A. C., Allen, G., Hamill, V., Janssen, G. G., Dunn-Coleman, N., Karos, M., Lemaire, H. G., Subkowski, T., Bollschweiler, C., Turner, G., Nusslein, B., Fischer, R. Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5020-5026, 2006.
- Martínez, Á. 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. *International Microbiology*. 8: 195-204, 2005.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60:551-565, 2002.
- Menezes, C. B., Bonugli- Santos, R.C., Miqueletto, P.B., Passarini, M.R.Z., Silva, C.H.D., Justo, M.R., Leal, R.R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D., Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*. In press doi:10.1016/j.micres.2009.09.005.
- Mummey, D.L., Rillig, M.C. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrhizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 70: 200–204, 2007.
- Namikoshi, M., Akano, K., Meguro, S., Kasuga, I., Mine, Y., Takahashi, T., Kobayashi, H. A new macrocyclic trichothecene, 12, 13-deoxyroridin E, produced by the marine-derived fungus *Myrothecium roridum* collected in Palau. *Journal of Natural Products*.64: 396-398, 2001.

- Novotný, C., Erbanova, P., Cajthaml, T., Rothschild, N., Dosoretz, C., Sasek, V. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54: 850-853, 2000.
- Novotný, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., Sasek, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1545–1551, 2004.
- O'Donnell, K.F., Lutzoni, T.J., Ward, G. L. Benny. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (*Zygomycota*): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia*. 93:286-296, 2001.
- Osterhage, C. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi. Tese de Doutorado. Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha, 2001.
- Passarini, M.R.Z. Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. 2008.
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C.M., Tiburtius, E.R.I., Moraes, S.G., Rosa, M.A., Minussi, R.C., Durán, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis*. 42: 131–144, 2003.
- Potin, O., Rafin, C., Veignie, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 54: 45-52, 2004.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'Souza, T.M., Reddy, C.A. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. *Botanica Marina*, 37: 515-523, 1994.

- Raghukumar, C., Chandramohan, D., Michel, F.C. JR., Reddy, C.A. Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi. *Biotechnology Letters*. 18: 105–108, 1996.
- Raghukumar, C., D'Souza, T.M., Thorn, R.G., Reddy, C.A. Lignin-Modifying Enzymes of *Flavodon flavus*, a Basidiomycete Isolated from a Coastal Marine Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2103–2111, 1999.
- Raghukumar, C. Bioremediation of coloured pollutants by terrestrial versus facultative marine fungi. In: Fungi in Marine Environment. (ed. K.D. Hyde) *Fungal Diversity Research Series*. 7: 317-344, 2002.
- Raghukumar, C., Shailaja, M.S., Parameswaran, P.S., Singh, S.K. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous media by the marine fungus NIOCC#312: involvement of lignin-degrading enzymes and exopolysaccharides. *Indian Journal of Marine Sciences*. 35: 373–379, 2006.
- Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., Verma, A.K. Treatment of Colored Effluents with Lignin-Degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-Derived Fungi. *Critical Reviews in Microbiology*. 34:189–206, 2008.
- Reddy, C.A. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *P.chrysosporium*. *Journal Biotechnology*. 30: 91-107, 1993.
- Rocha, L.C., Ferreira, H.V., Pimenta, E.F., Berlinck, R.G.S., M.H.R., Javaroti, D.C.D., Sette, L.D., Bonugli, R.C., Porto, A.L.M. Bioreduction of  $\alpha$ -chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. *Biotechnology Letters*. 31:1559–1563, 2009.
- Rodgers, C.J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., Skamniotl P., Armstrong, F.A., Gurr, S.J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology*. In Press doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.001.

- Sette, L.D., Oliveira, V.M., Manfio, G.P. Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 81-89, 2005.
- da Silva, M., Cerniglia, C.E., Pothuluri, J.V., CanhoS, V.P. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 19: 399-405, 2003.
- da Silva, M.; Passarini, M.R.Z.; Bonugli, R.C.; Sette, L.D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*. 29: 1331-1339, 2008.
- Schouten, A., Wagemakers, C.A.M., Stefanato, F., Van Der Kaaij, R.M., Van Kan, J.A.L. Resveratrol acts as a natural antifungal and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology*, 43:883- 894, 2002.
- Stackebrandt, E., Liesack, W. Nucleic acids and classification. In: M. Goodfellow and A. O'Donell, eds., *Modern Approaches in Bacterial Systematics*. p.151-194, London Academic Press, 1993.
- Steffen, K. T., Schubert, S., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation*. 18: 359-369, 2007.
- Surajit, D., Lyla, P.S., Ajmal Khan, S. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*. 90(10), 2006.
- Sutar, R., David, J.K., Ghosh, A.K., Singhi, S., Chakrabarti, A., Bachhawat, A.K. Comparison of ITS and IGS regions for strain typing of clinical and non-clinical isolates of *Pichia anomala*. *Journal of Medical Microbiology*. 53: 1-5, 2004.
- Sutherland, J. B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology*. 9: 53-62, 1992.

- Takamatsu, S., Matsuda, S., Niinomi, S., Havrylenko, M. Molecular phylogeny supports a Northern Hemisphere origin of *Golovinomyces* (Ascomycota: Erysiphales). *Mycological Research*. 110: 1093-1101, 2006.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 295-347, 2007.
- Temp, U., Zierold, U., Eggert, C. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Gene*. 236:169-177, 1999.
- Tetsch, L., Bend, J., Janßen, M., Holker, U. Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. *FEMS Microbiology Letters*. 245: 161–168, 2005.
- Tien, M., Kirk, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 81: 2280-2284, 1984.
- Thompson, G., Swain, J., Kay, M., Forste, R.C.F. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technology*. 77: 275–28, 2001.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. 72: 169-183, 2000.
- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A., Vazquez-Duhalt, R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 289–299, 2003.
- Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell*. 6:1191-1192, 1994.
- Verdin, A., Sahraoui, A. L., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Durand, R. Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. *Mycological Research*. 110: 479-484, 2006.

- Wang, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33: 545–551, 2006.
- Wang, G., li, Q., Zhu, P. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93:163-174, 2008.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22:161-187, 2003.
- Williams, J.G.K., KubellK, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535. 1990.
- Wong, Y., Yu, J. Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*. 33: 3512–3520, 1999.
- Wu, J., Xiao, Y.-Z., Yu, H.-Q. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology*. 96:1357–1363, 2005.
- Yli-Matilla, T., Mach, R. L., Alekhina, I. A., Bulat, S. A., Koskinen, S., Kullning-Gradinger, C. M., Kubicek, C. P., Klemsdal, S. S. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, h-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 95: 267– 285, 2004.

## **OBJETIVO GERAL**

O presente projeto teve como objetivo geral avaliar a diversidade genética e o potencial biotecnológico de fungos associados aos macro-organismos marinhos derivados de dois Projetos FAPESP, desenvolvidos na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP:

1) FAPESP 05/1213-8 e, 2) FAPESP 05/60175-2, visando os seguintes objetivos específicos:

### **Objetivos Específicos**

#### **Fungos derivados de cnidários marinhos (projeto FAPESP 05/1213-8)**

- Avaliar a diversidade genética por meio do método de ARDRA;
- Avaliar o potencial biotecnológico por meio da produção de enzimas ligninolíticas e de biosurfactantes;
- Avaliar a atividade de enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos selecionados em diferentes fontes de carbono, salinidade e sob indução do farelo de trigo, utilizando o planejamento de experimento.

#### **Fungos derivados de esponjas marinhas (projeto FAPESP 05/60175-2)**

- Caracterizar taxonomicamente os três isolados estudados;
- Avaliar a atividade de enzimas ligninolíticas;
- Avaliar a adição de indutores na atividade das enzimas ligninolíticas;
- Detectar e caracterizar os genes que codificam para a lacase;
- Avaliar a atividade de descoloração do corante RBBR;
  
- Depositar os isolados que apresentarem potencial biotecnológico na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

## **CAPÍTULO 1. DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS ASSOCIADOS A CNIDÁRIOS MARINHOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

**Rafaella Costa Bonugli-Santos<sup>1,2</sup>, Lucia Regina Durrant<sup>1</sup> e Lara Durães Sette<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa postal: 6121, CEP 13083-862, SP, Brasil

<sup>2</sup> Divisão de Recursos Microbianos – CPQBA, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal: 6171, CEP 13081-970 Paulínia, SP, Brasil

**Parte deste capítulo foi publicada no artigo: Avaliação do potencial biosurfactante de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos com atividade de degradação de HPAs. *Microbiologia in foco*, v. 7, p. 12-17, 2009.**

### **RESUMO**

O interesse pelo conhecimento da diversidade e pela aplicação biotecnológica de microorganismos pertencentes a nichos ecológicos pouco explorados, como os fungos filamentosos de origem marinha, tem crescido nos últimos anos. Entretanto, a diversidade de fungos filamentosos derivados de ambientes marinhos é ainda pouco conhecida. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética e o potencial para produção de enzimas ligninolíticas e de biosurfactantes por fungos filamentosos isolados de cnidários marinhos. Os dados derivados das análises de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) para os 116 isolados analisados permitiram a identificação de 46 ribotipos distintos, os quais foram submetidos ao sequenciamento do DNAr, visando a identificação taxonômica. Os fungos filamentosos, na sua maioria, foram caracterizados como pertencentes ao filo Ascomycota, distribuídos em 6 ordens e 13 gêneros, sendo um único isolado representante do filo Zygomycota. Do ponto de vista biotecnológico, 42% dos isolados apresentaram atividade de enzima lacase (Lac), 67% de manganês peroxidase (MnP) e 70% de lignina peroxidase (LiP), quando cultivados em caldo malte a 2% acrescido de 3% NaCl. Os resultados do presente trabalho permitiram o conhecimento da diversidade de fungos filamentosos associada a invertebrados marinhos da costa brasileira, bem como destacaram o potencial para aplicação biotecnológica destes organismos em ambientes e/ou processos salinos.



**PALAVRAS CHAVE:** Fungos marinhos, diversidade genética, potencial biotecnológico e enzimas ligninolíticas.

## 1. INTRODUÇÃO

O potencial biotecnológico dos fungos filamentosos, de maneira geral, tem sido bem explorado em diversas atividades de importância sócio-econômica, incluindo a produção de alimentos e vitaminas; obtenção de antibióticos e antitumorais; produção de biosurfactantes e de enzimas com aplicação na degradação de poluentes ambientais.

Os recursos genéticos microbianos obtidos de ambientes marinhos transformaram-se em uma importante fonte para aplicação biotecnológica, por possibilitarem a obtenção e a produção de novos compostos biologicamente ativos e funcionais (Bugni e Ireland, 2004; Taylor et al., 2007). As principais atividades biológicas relacionadas aos fungos derivados marinhos são propriedades antimicrobianas e antitumorais (Bugni e Ireland, 2004). Entretanto, a produção de enzimas e a degradação de compostos poluentes ambientais por estes microorganismos têm sido relatadas na literatura (Menezes et al., 2009).

Entre as enzimas extracelulares produzidas por fungos, as ligninolíticas, vêm sendo amplamente estudadas na degradação de compostos tóxicos, como os pesticidas, corantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e outros poluentes orgânicos (Durán e Esposito, 2000; Wesenberg et al., 2003; Haas et al., 2004; Majeau et al., 2009). Fungos marinhos já foram isolados de madeira em decomposição e de detritos vegetais em águas costeiras (Kohlmeyer e Kohlmeyer 1979; Hyde et al., 2000; Raghukumar, 2002) reportados na literatura como produtores de enzimas ligninolíticas (Raghukumar, 2008).

Os fungos ligninolíticos derivados de ambiente marinho podem ser utilizados na degradação de HPAs em ambiente salino. Entretanto, muitas vezes o acesso aos HPAs pelo micélio fúngico precisa ser facilitado e, neste contexto, os biosurfactantes, compostos

microbianos capazes de diminuir a tensão superficial devido à atividade surfactante, poderiam atuar na emulsificação dos HPAs em água, resultando no aumento da degradação destes poluentes no ambiente (Harayama, 1997; Bento et al., 2005; Mulligan, 2005; Hua, 2006). Entretanto, são poucas as informações sobre a produção de biosurfactantes por microorganismos marinhos ou derivados de ambientes marinhos (Maneerat, 2005). Neste sentido, a avaliação da atividade biosurfactante e ligninolítica em fungos derivados de ambientes marinhos pode ser considerada como uma estratégia interessante para otimização da degradação de HPAs e outros poluentes ambientais, principalmente em derramamentos de petróleo nos oceanos e sedimentos marinhos.

Levando-se em consideração o fato de que a conservação e o uso sustentável da diversidade biológica requerem um conhecimento detalhado da riqueza de espécies, abundância e distribuição, e que pouco se sabe sobre a diversidade filogenética e funcional das comunidades microbianas marinhas, principalmente no Brasil, o objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade e o potencial biotecnológico para a produção de enzimas ligninolíticas e de biosurfactantes em fungos filamentosos associados a cnidários marinhos coletados no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Fungos associados a cnidários marinhos**

Os fungos filamentosos estudados neste trabalho foram isolados de cnidários marinhos (*Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* e *Zoanthus solanderi*), coletados na cidade de São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, Brasil, conforme da Silva et al. (2008), no âmbito do Projeto FAPESP 05/1213-8 “Fungos derivados de ambientes marinhos: isolamento, caracterização taxonômica e avaliação do potencial biotecnológico” (coordenado pela Dra. Lara D. Sette, CPQBA/UNICAMP). No isolamento as amostras de cnidários marinhos

foram trituradas e diluídas para serem plaqueadas nos meios de cultivo (Marine Agar e 2% extrato de malte + 3% de NaCl) suplementados com sulfato de estreptomicina (da Silva et al., 2008).

## **2.2 Avaliação da diversidade genética e caracterização taxonômica**

### **2.2.1 Extração e amplificação do DNA genômico**

Os isolados foram cultivados em caldo Sabouraud Dextrose Ágar (Oxoid Brasil LTDA) a 28°C, e sob agitação de 140 rpm. Após 7 dias de cultivo, o DNA genômico de cada isolado foi extraído, de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). Para a remoção do RNA, 1 µL de RNase (10 mg ml<sup>-1</sup>) foi adicionado à suspensão contendo o DNA extraído e a mesma foi, então, submetida à incubação a 37°C por 60 minutos. Os resultados da extração de DNA foram visualizados em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo (1 µL/100 mL) e fotodocumentados, utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, Bioluminescence System). As estimativas das concentrações de DNA foram feitas através da comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ). Os DNA foram, então, estocados em freezer a -20 °C.

A região D1/D2 do DNAr 28S foi amplificada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras, utilizando *primers* homólogos a regiões conservadas para o grupo dos fungos: NL-1m (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL-4m (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG 3') (O'Donnell, 1993). A reação de PCR foi composta de: 0,4 mM de cada primer, 0,2 mM dNTPs (GE Healthcare), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2,0 U Taq polimerase (Invitrogen) e 1,0 X tampão de reação (Invitrogen) e 5-25 ng de DNA genômico, para um volume final de 25 µL. As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador (Eppendorf) com uma etapa inicial de desnaturação por 5 min a 95 °C,

seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 1 min a 55 °C (anelamento) e 3 min a 72 °C (extensão), seguido por um ciclo de extensão final de 3 min a 72 °C.

### **2.2. 2 ARDRA, Sequenciamento e Análise filogenética**

A avaliação de polimorfismo genético dentre os fungos filamentosos isolados de cnidários marinhos foi realizado pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Os produtos do PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII*, *RsaI* e *MspI* (GE Healthcare), cerca de 5 µL do produto de amplificação foi utilizado em reações independentes de restrição enzimática a 37 °C por 2 horas. Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio (0,1 µg/mL). Os perfis de bandas (ribotipos) dos isolados foram visualizados em transiluminador UV e documentados. Os ribotipos gerados pelas digestões enzimáticas foram utilizados para diferenciar os isolados de fungos filamentosos representantes de grupos taxonômicos distintos, os quais foram submetidos ao sequenciamento, visando identificação taxonômica.

Os produtos de amplificação (região D1/D2) foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare). As sequências obtidas com cada *primer* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* e comparadas com as sequências de genes de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo alvo foram recuperadas dos bancos de dados para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Clustal X

(Thompson et al., 1994); e as análises filogenéticas e moleculares, utilizando o software MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). O modelo de Kimura (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva; e o algoritmo *neighbor-joining* (NJ) para as reconstruções filogenéticas com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 pseudo-replicatas.

A caracterização morfológica dos grupos taxonômicos foi realizada através da observação das características da colônia em estereoscópio (MZ6 Leica, Wetzlar, Alemanha) e lâminas coradas com lactofenol e azul de algodão utilizando um microscópio de luz (Leica DM LS, Wetzlar, Alemanha). Os fungos foram identificados com base nessas observações e, por critérios morfológicos, determinados na literatura (Ellis, 1971; Pitt, 1979; Domsch, 1980).

### **2.3 Avaliação da atividade de enzimas ligninolíticas**

Para a avaliação da atividade enzimática, os fungos filamentosos selecionados pelo ARDRA como representantes de ribotipos distintos foram cultivados em meio Ágar Malte 2% (MA2: 2% de extrato de malte e 2% de ágar), acrescido de 3% de NaCl e 2 cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo extrato de malte 2% + 3% NaCl, em duplicata. As culturas foram incubadas durante 7 dias sob agitação de 140 rpm a 28 °C, em seguida, foi preparado um extrato enzimático para a avaliação da atividade ligninolítica, centrifugando as amostras a 12.074 g por 30 minutos a 4 °C. O meio sem inóculo foi utilizado como branco e como controle abiótico na avaliação enzimática.

#### **2.3.1 Determinação Enzimática**

A atividade enzimática dos extratos obtidos de cada ensaio foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS (Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japan) e expressas em  $UL^{-1}$  ( $\mu$ moles produto/min. x Litro), obtidas através da equação:

$$UL^{-1} = \frac{\Delta Abs \times 10^6}{\epsilon \times R \times T}$$

$\Delta Abs$  = absorbância (final – inicial)  
 $\epsilon$  = absorção molar  
 $R$  = quantidade de caldo enzimático (litro)  
 $T$  = tempo de reação (minutos)

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto e por litro da solução de enzima.

#### **2.3.1.1 Lignina Peroxidase (LiP, E.C:1.11.1.14)**

A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido ( $\epsilon = 9300M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) na oxidação do álcool veratrílico que foi usado como substrato. A mistura continha 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0; 0,5 mL de álcool veratrílico 10mM; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e a separação do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm (Arora e Gill, 2001).

#### **2.3.1.2 Manganês Peroxidase (MnP, E.C:1.11.1.13)**

A MnP foi quantificada através da oxidação do vermelho de fenol a 610 nm ( $\epsilon = 4.460 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A mistura da reação foi composta de 0,5 mL de solução de extrato enzimático; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,01%; 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,05 mL  $MnSO_4$  2 mM; 0,05 mL de peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio 20 mM pH 4,5. A mistura foi incubada a 30 °C por 5 minutos e a reação interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH (2 N) (Kuwahara et al., 1984).

### **2.3.1.3 Lacase (E.C:1.10.3.2)**

A atividade enzimática de lacase foi determinada usando 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) como substrato enzimático. A mistura foi composta de 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0; 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,6 mL da solução enzimática (Buswell et al., 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorvância a 420 nm.

### **2.4 Avaliação da produção de biosurfactantes**

Os fungos filamentosos, selecionados pelo ARDRA como representantes de ribotipos distintos, foram previamente cultivados em meio MA2 acrescido de 3% de NaCl durante 7 dias a 28°C. Após este período, 2 cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das culturas foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl, e incubados por 72 h a 28 °C e 140 rpm. Uma alíquota de 10 mL deste cultivo foi utilizada para inocular 100 mL de meio salino (0,6 g MgSO<sub>4</sub>; 3,6 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 g Kh<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3% NaCl), submetido à incubação a 28 °C sob agitação de 140 rpm, sendo adicionado 1% de hexadecano, após 72 h. Os ensaios foram incubados por 15 dias nas mesmas condições. Após o período de cultivo, o sobrenadante foi obtido por meio de centrifugação a 12.074g por 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicatas. A produção de biosurfactantes foi determinada pelo teste de redução da tensão superficial, utilizando-se tensiômetro da marca Krüs.

Os isolados que apresentaram redução significativa da tensão superficial foram submetidos ao teste de emulsificação através da agitação vigorosa de tubos contendo 3,5 mL dos extratos das amostras com 2,0 mL de óleo diesel e tolueno (Willumsen e Karlson, 1997). Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi determinada pela leitura da absorvância (Abs) e relatada como atividade de emulsificação (Johnson et al., 1992). A

produção corresponde à diferença entre o cálculo da absorvância antes e após a agitação. Ensaio com o meio salino acrescido de 1% de hexadecano sem inóculo foram utilizados como controle; e ensaios apenas como meio salino, como branco.

### **3. RESULTADOS**

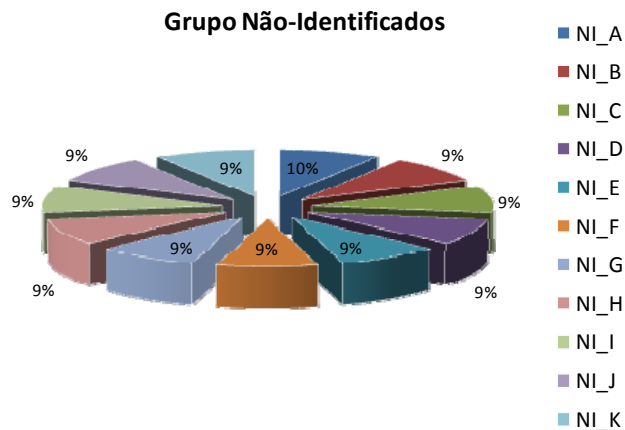
#### **3.1 Diversidade genética e caracterização taxonômica de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos**

Os 116 fungos filamentosos isolados a partir das amostras de cnidários marinhos *Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* e *Zoanthus solanderi* no âmbito do projeto FAPESP 05/1213-8 e, preliminarmente, classificados morfológicamente pela Dra. Manuela da Silva (INCQS/FIOCRUZ) e Dra. Lara D. Sette (CBMAI/UNICAMP) em 6 diferentes grupos (da Silva et al., 2008, Passarini, 2008): **1)** fungos pertencentes ao grupo dos Dematiaceae (caracterizados por apresentarem pigmentação melaninogênica na parede celular, grupo de coloração escura); **2)** fungos pertencentes ao grupo dos *Penicillium*; **3)** fungos pertencentes ao grupo dos *Aspergillus*; **4)** fungos pertencentes ao grupo dos *Trichoderma*; **5)** fungos pertencentes ao grupo dos *Fusarium*; e **6)** Grupo dos fungos não-identificados (NI) (fungos hialinos pertencentes a grupos taxonômicos desconhecidos ou que não apresentaram esporulação em meio de cultura), foram selecionados para a avaliação da diversidade genética e caracterização taxonômica.

Os resultados obtidos pela técnica de ARDRA revelaram a presença de 46 ribotipos distintos: 7 ribotipos para os Dematiaceae (25 isolados); 10 ribotipos para os *Aspergillus* spp. (19 isolados); 12 ribotipos para os *Penicillium* spp. (52 isolados); 4 ribotipos para os *Trichoderma* spp. (4 isolados); 2 ribotipos para *Fusarium* spp. (2 isolados); e 11 ribotipos para os fungos do grupo dos não-identificados (14 isolados). A diversidade genética (número de ribotipos distintos)

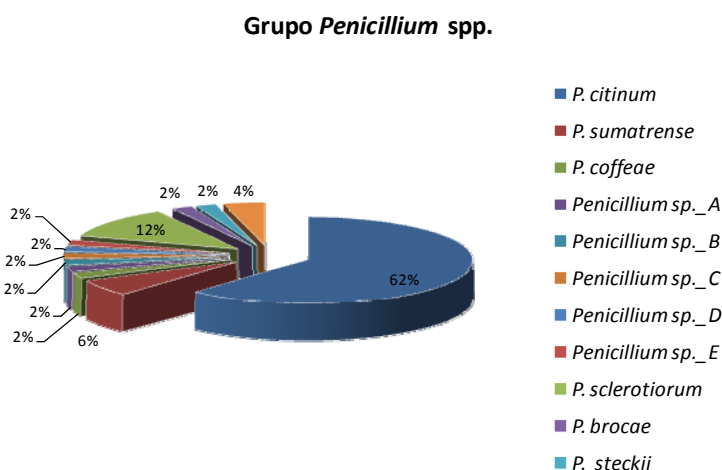


dentre os grupos taxonômicos caracterizados preliminarmente está ilustrada nas figuras 1, 2, 3 e 4.

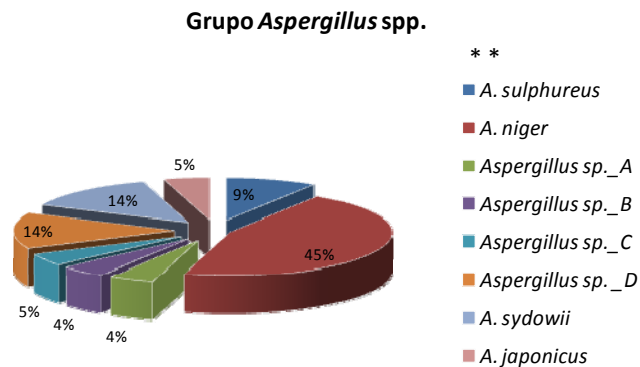


**Figura 1.** Ocorrência de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos caracterizados como Não-Identificados (NI) em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto.

O grupo dos *Penicillium* foi o grupo de maior número de isolados (52), contudo a análise do ARDRA revelou uma diversidade relativamente baixa. O fungo *Penicillium citrinum* representou, aproximadamente, 64% dos isolados, os quais foram agrupados em um mesmo ribotipo (Fig. 2). Resultado semelhante foi obtido para o grupo dos *Aspergillus*, onde 45% dos isolados, agrupados em um único ribotipo, corresponderam ao fungo *Aspergillus niger* (Fig. 3).

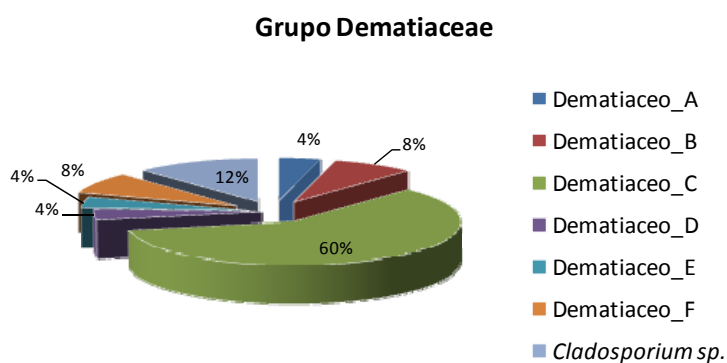


**Figura 2.** Ocorrência de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos caracterizados como *Penicillium* em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto.



**Figura 3.** Ocorrência de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos caracterizados como *Aspergillus* em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto.

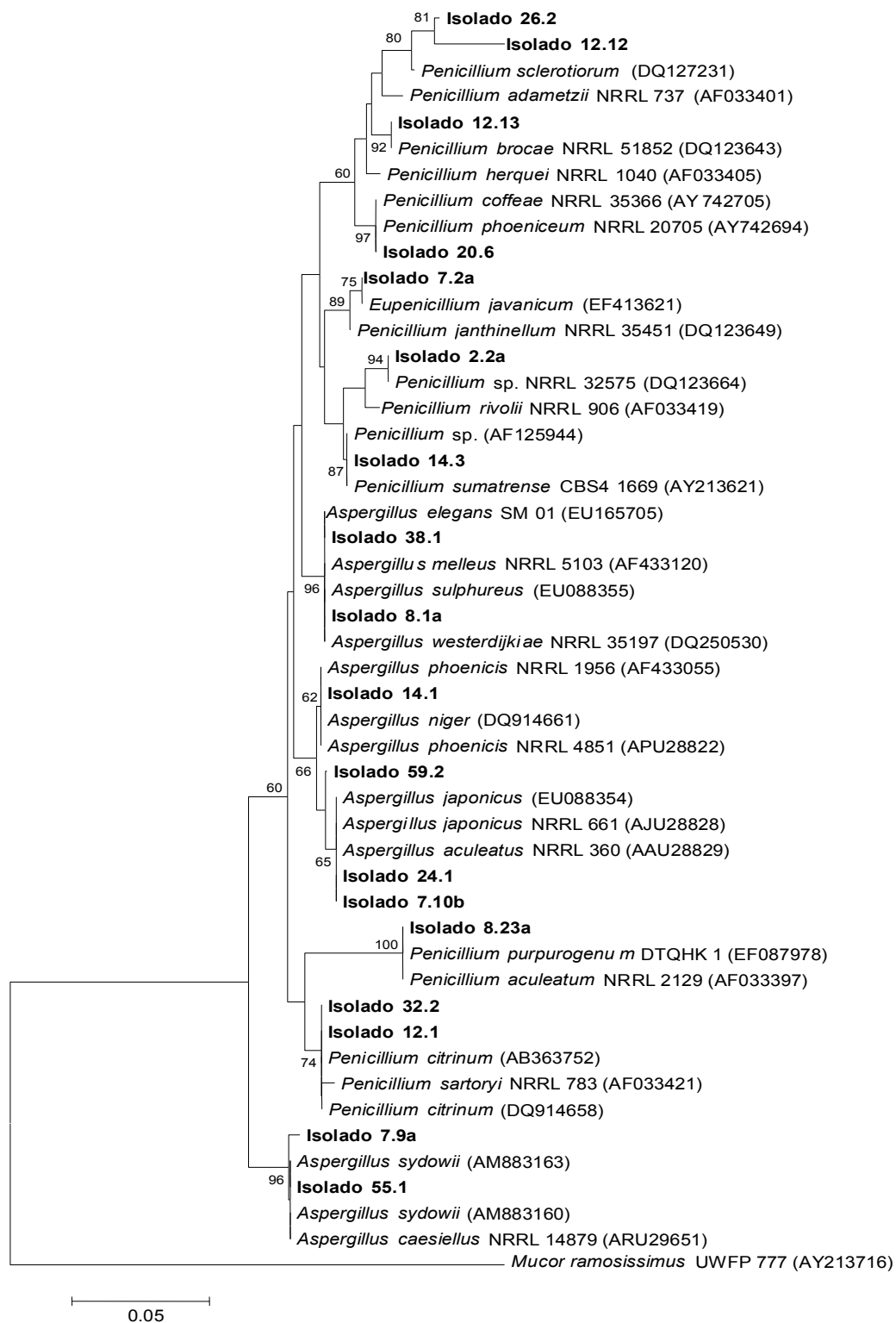
No grupo dos Dematiaceae também houve a predominância de um ribotipo (Fig. 4), porém não foi possível a identificação de todos os isolados pelos métodos morfológicos. Entretanto, os isolados identificados morfológicamente como *Cladosporium* sp., não apresentaram variabilidade genética (3 isolados, 1 ribotipo, Fig. 4 - *Cladosporium* sp.). Entre o grupo dos *Trichoderma* e *Fusarium*, os isolados estudados mostraram perfis de restrições diferentes (4 isolados e 4 ribotipos, 2 isolados e 2 ribotipos, respectivamente).



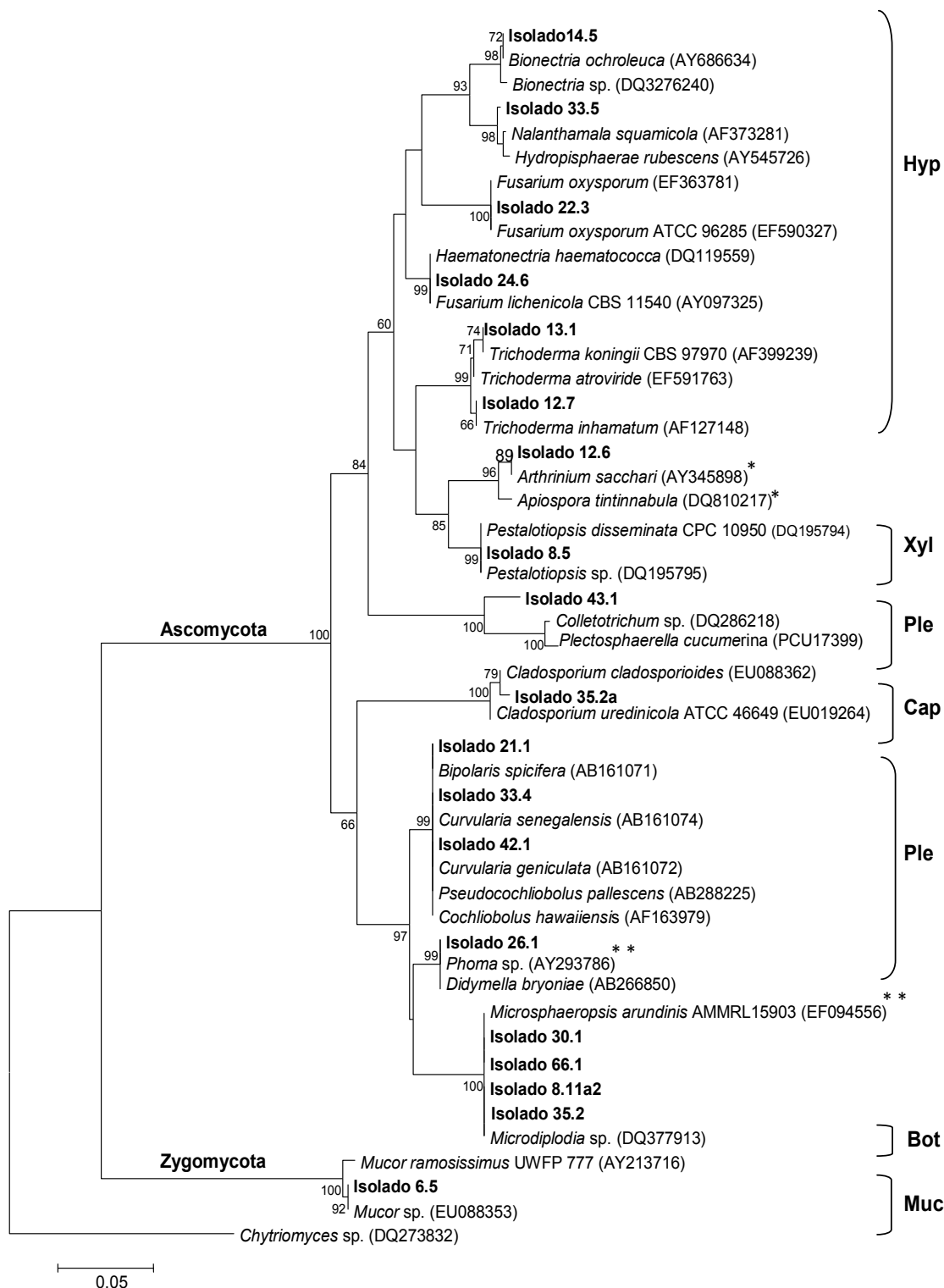
**Figura 4.** Ocorrência de fungos filamentosos classificados no grupo Dematiaceae em relação ao número de isolados (%) de cada ribotipo distinto.

Um isolado de cada fungo representante de ribotipo distinto foi submetido ao sequenciamento de DNA e análise filogenética, visando uma identificação mais acurada.

Os resultados combinados das análises moleculares e convencionais revelaram que os isolados estudados estão, em sua maioria, distribuídos no filo Ascomycota, incluindo 6 ordens e 13 gêneros distintos (Fig. 5 e Fig. 6): Eurotiales (*Aspergillus* e *Penicillium*); Hypocreales (*Bionectria*, *Fusarium* e *Trichoderma*), Pleosporales (*Cochliobolus*); Xylariales (*Pestalotiopsis*); Capnodiales (*Cladosporium*); Helotiales (*Articulospora*). Em adição, foram identificados dois isolados do gênero *Microsphaeropsis* e um do gênero *Phoma*, pertencentes ao grupo dos Coelomycetes e um representante do gênero *Arthrinium* (família Apiosporaceae). O filo Zygomycota foi representado por um único isolado da ordem *Mucorales* pertencente ao gênero *Mucor*. Cabe ressaltar que a identificação até espécie dos isolados caracterizados no presente estudo irá depender de análises taxonômicas adicionais.



**Figura 5.** Árvore filogenética estruturada com base nas sequências de DNAr 28S (500 pb) dos fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, ordem Eurotiales (Ascomycota).



**Figura 6.** Árvore filogenética estruturada com base nas sequências de DNAr 28S (500 pb) dos fungos do Filo Ascomycota, ordens *Hypocreales* (Hyp), *Pleosporales* (Ple), *Xylariales* (Xyl), *Capnodiales* (Cap), *Botryosphaeriales* (Bot) e Filo Zygomycota, ordem *Mucorales* (Muc).

### 3.2 Potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a cnidários

#### marinhos

Os isolados recuperados das amostras de cnidários marinhos, representantes de grupos taxonômicos distintos, foram submetidos aos ensaios de produção de enzimas ligninolíticas e de biosurfactantes, visando à aplicação em processos de biorremediação, principalmente no ambiente marinho ou em ambientes com elevada salinidade.

Os isolados foram avaliados quanto à atividade das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase e os resultados foram expressos em  $UL^{-1}$ . Dentre os fungos derivados de cnidários marinhos selecionados para este estudo (46 isolados), 42% apresentaram atividade positiva para a enzima lacase (Tabela 1). Representantes do gênero *Penicillium* apresentaram os melhores valores de atividade enzimática, com destaque para o isolado *P. citrinum* (32.2) capaz de produzir cerca de  $310 UL^{-1}$  de lacase. Fungos pertencentes aos gêneros *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Bionectria*, *Cladosporium* e *Trichoderma*, bem como representantes do grupo dos Dematiaceae e dos fungos não identificados, também apresentaram atividade de lacase, variando entre 2,31 a  $32,41 UL^{-1}$ .

**Tabela 1.** Atividade de lacase em caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl após 7 dias de cultivo.

Isolado	Identificação	Enzima UL <sup>-1</sup>
32.2	<i>Penicillium citrinum</i>	307,8
20.1	<i>Penicillium citrinum</i>	64,81
21.3	<i>Penicillium</i> sp.	46,30
8.23A	<i>Penicillium</i> sp.	43,98
43.3	<i>Bionectria</i> sp.	32,41
66.1	Dematiaceae	32,41
21.1	Dematiaceae	32,41
8.9	NI	23,15
12.13	<i>Penicillium</i> sp.	23,15
18.3	<i>Aspergillus sydowii</i>	20,83
8.18	Dematiaceae	18,52
12.6	<i>Arthrinium</i> sp.	16,20
26.2	<i>Penicillium</i> sp.	16,20
12.4	Dematiaceae	11,57
33.5	NI- Hypocreales	11,57
8.2A	<i>Aspergillus sulphureus</i>	9,26
18.9A	<i>Cladosporium</i> sp.	9,26
14.3	<i>Penicillium sumatrense</i>	4,63
20.6	<i>Penicillium</i> sp.	3,94
78.1	<i>Cladosporium</i> sp.	2,31
8.26	<i>Trichoderma</i> sp.	2,31

NI -Não Identificado

A atividade de MnP dos fungos derivados marinhos foi mais expressiva em comparação com a atividade de lacase. Cerca de 67% dos isolados mostraram capacidade de produzir esta enzima, incluindo todos os isolados do gênero *Aspergillus* e de *Penicillium citrinum*. O fungo *Penicillium sclerotiorum* apresentou a melhor atividade de MnP (4484,30 UL<sup>-1</sup>), seguido pelo fungo *Cladosporium* sp. (4394,62 UL<sup>-1</sup>) e *P. citrinum* (4170,40 UL<sup>-1</sup>). O único representante do filo Zygomycota, o isolado *Mucor* sp., apresentou atividade de MnP (de 2600,90 UL<sup>-1</sup>). Cabe

ressaltar que apenas os isolados que mostraram atividade significativa (valores superiores a 2.500 UL<sup>-1</sup> da enzima) estão listados na tabela 2. Em adição, todos os isolados classificados como Dematiaceae e os isolados representantes do gênero *Fusarium*, não apresentaram atividade de MnP.

**Tabela 2.** Atividades de MnP em caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl após 7 dias de cultivo .

Isolado	Identificação	Enzima UL <sup>-1</sup>
24.9	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	4484,30
78.1	<i>Cladosporium</i> sp.	4394,62
49.2	<i>Penicillium citrinum</i>	4170,40
52.2	<i>Penicillium</i> sp.	3901,35
12.12	<i>Penicillium</i> sp.	3721,97
43.3	<i>Bionectria</i> sp.	3587,44
18.9A	<i>Cladosporium</i> sp.	3183,86
7.9A	<i>Aspergillus</i> sp.	3139,01
18.3	<i>Aspergillus sydowii</i>	3094,17
21.3	<i>Penicillium</i> sp.	3004,48
8.5	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2825,11
12.7	<i>Trichoderma</i> sp.	2825,11
33.5	NI- Hypocreales	2690,58
38.1	<i>Aspergillus</i> sp.	2645,74
6.5	<i>Mucor</i> sp.	2600,90
8.2A	<i>Aspergillus sulphureus</i>	2511,21
32.2	<i>P. citrinum</i>	2511,21

NI -Não Identificado

A atividade da LiP mostrou um perfil semelhante ao obtido na avaliação da atividade da MnP, quanto ao número de isolados positivos (70%) e também aos grupos taxonômicos (tabela 3). Os fungos do gênero *Penicillium* apresentaram atividade de LiP, sendo o *Penicillium* sp. (14.11) o que apresentou a maior produção desta enzima (85.268,82 UL<sup>-1</sup>). Entretanto,



atividades significativas foram também observadas para o *Mucor* sp. (6.5) (75.376,34 UL<sup>-1</sup>) e *Aspergillus sydowii* (18.3) (65.913,98 UL<sup>-1</sup>). Cabe ressaltar que apenas os isolados que mostraram atividade significativa (valores superiores a 17000 UL<sup>-1</sup> da enzima) estão listados na tabela 3. A atividade de LiP não foi observada para os fungos do gênero *Fusarium* e do grupo dos Dematiaceae, com exceção do fungo *Cladosporium* sp. (78.1).

**Tabela 3.** Atividades de LiP em caldo malte 2% acrescido de 3% NaCl após 7 dias de cultivo.

Isolado	Identificação	Enzima UL <sup>-1</sup>
14.11	<i>Penicillium</i> sp.	85268,82
6.5	<i>Mucor</i> sp.	75376,34
18.3	<i>Aspergillus sydowii</i>	65913,98
7.2a	<i>Penicillium janthinellum</i>	56451,61
24.9	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	41290,32
33.5	NI	28924,73
38.1	<i>Aspergillus</i> sp.	28924,73
21.3	<i>Penicillium</i> sp.	24731,18
8.21	<i>Penicillium</i> sp.	21505,38
20.1	<i>Penicillium citrinum</i>	21397,85
18.9A	<i>Cladosporium</i> sp.	21075,27
39.2	NI	20645,16
43.1	NI	20107,53
12.13	<i>Penicillium brocae</i>	19677,42
14.3	<i>Penicillium sumatrense</i>	19569,89
8.2A	<i>Aspergillus sulphureus</i>	17956,99
7.9A	<i>Aspergillus</i> sp.	17956,99
78.1	<i>Cladosporium</i> sp.	17419,35

NI -Não Identificado

Com relação à produção de biosurfactantes pelos fungos derivados de cnidários marinhos, representantes de grupos taxonômicos distintos, apenas 9 isolados apresentaram resultados significativos frente à redução da tensão superficial, ou seja, valores de tensão superficial inferiores ao controle (tabela 4). Entretanto, esses 9 isolados não apresentaram

atividade emulsificante, ou seja, não houve diferença entre o cálculo da absorvância antes e após a agitação da emulsão óleo em água.

**Tabela 4.** Atividade de redução da tensão superficial por fungos filamentos associados a cnidários marinhos.

Isolado	Identificação	Tensão Superficial (mN/m) Controle (54.6 mN/m)
24.6	<i>Fusarium</i> sp.	43,3 <sup>1</sup> ± 3,82 <sup>2</sup>
43.3	<i>Bionectria</i> sp.	44,4 <sup>1</sup> ± 3,26 <sup>2</sup>
42.1	Dematiaceae	48,6 <sup>1</sup> ± 0,49 <sup>2</sup>
32.2	<i>Penicillium citrinum</i>	44,0 <sup>1</sup> ± 7,33 <sup>2</sup>
2.2a	<i>Penicillium</i> sp.	45,4 <sup>1</sup> ± 6,35 <sup>2</sup>
43.1	Ascomiceto	46,5 <sup>1</sup> ± 6,09 <sup>2</sup>
30.1	Dematiaceae	51,5 <sup>1</sup> ± 2,58 <sup>2</sup>
20.6	<i>Penicillium coffeae</i>	50,9 <sup>1</sup> ± 4,38 <sup>2</sup>
6.5	<i>Mucor</i> sp.	53,2 <sup>1</sup> ± 2,40 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Média – <sup>2</sup>Desvio padrão

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade genética e caracterização taxonômica de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos

Os fungos filamentosos caracterizados no presente trabalho podem ser classificados como fungos marinhos facultativos, que são organismos de ambientes de água doce ou terrestres, capazes de crescer (e possivelmente esporular) no ambiente marinho (Kohlmeyer e Kohlmeyer, 1979). Esta classificação pode ser evidenciada a partir do agrupamento dos isolados com fungos filamentosos terrestres nas análises filogenéticas (Figura 5 e 6).

A maioria dos fungos isolados de invertebrados marinhos amostrados no presente trabalho (99%) estão relacionados ao filo Ascomycota. Representantes deste filo foram isolados de algas marinhas, corais, esponjas e tunicados em diferentes partes do mundo (Wang et al., 2008; Li e Wang, 2009; Menezes et al., 2009). De acordo com Menezes et al. (2009), a

predominância do grupo Ascomycota nos ambientes aquáticos tem sido bem discutida na literatura. Este grupo representa os fungos que são facilmente cultiváveis (Baker et al., 2008) e pode ser facilmente recuperados pela técnica de isolamento, sendo a principal hipótese sobre a predominância de Ascomycota em invertebrados marinhos o fato de que seus esporos podem apresentar adaptações (como produção de apêndices) para o ecossistema aquático, o que facilita a flutuabilidade em água e aderência ao substrato (Prasannarai e Sridhar, 2001).

*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium* já foram relatados na literatura como fungos que habitam invertebrados marinhos (Holler et al., 2000; Morrison-Gardiner, 2002; Baker et al., 2008; Wang, 2006; Menezes et al., 2009) e foram encontrados associados a amostras de esponjas marinhas no Hawaii (Li e Wang, 2009) e no Brasil (Menezes et al., 2009). Entre estes, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Eupenicillium* são conhecidos como “esponja-generalistas” (Li e Wang, 2009).

Fungos Dematiaceae também já foram isolados de amostras marinhas, incluindo algas, cnidários e esponjas (Osterhage, 2001; Morrison-Gardiner, 2002; Shigemori et al., 2004), sendo comum em ambientes altamente estressados, como o Mar Morto e pântanos salinos (Grishkan et al., 2003).

A comparação e compilação dos dados de diversidade e distribuição de fungos associados a invertebrados marinhos são dificultadas pela grande diversidade de macro-organismos marinhos estudados, pela diferença metodológica entre os trabalhos, bem como pela falta de informação taxonômica dos fungos encontrados e a incorreta nomenclatura dos macro-organismos amostrados (Wang, 2006).

A grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura descreve a diversidade de fungos associados a esponjas marinhas. Até o momento, existem poucos trabalhos sobre a diversidade de fungos derivados marinhos na costa Brasileira. Um dos trabalhos mais recentes foi realizado por Menezes et al., (2009), onde foi abordada a diversidade de fungos

filamentosos recuperados de quatro diferentes amostras de esponjas marinhas. Muitos dos gêneros relatados por Menezes et al., (2009) foram também identificados neste presente trabalho, como é o caso dos esponjas-generalistas (*Penicillium* e *Aspergillus*), e também dos gêneros *Trichoderma*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Mucor*. No estudo de Menezes et al. (2009) além dos fungos pertencentes ao filo Ascomycota e Zygomycota citados anteriormente, representantes do filo Basidiomycota foram recuperados das amostras estudadas. A maior diversidade reportada no trabalho de Menezes et al. (2009) em relação este presente, possivelmente está relacionada com o tipo de macro-organismo estudado. As esponjas marinhas alimentam-se por filtração, bombeando a água através das paredes do corpo e, conseqüentemente, retêm impurezas do fitoplâncton e/ou outras matérias em suspensão. Portanto, de acordo com Wang et al. (2006), é razoável acreditar que alguns micro-organismos associados às esponjas produzam enzimas hidrolíticas para converter esta matéria orgânica em nutrientes. Por outro lado, os cnidários marinhos por se alimentarem através dos tentáculos e não reterem partículas orgânicas no interior de seu corpo devem ter acesso a uma diversidade microbiana bem mais restrita (Bumann e Jarm, 1998).

#### **4.2 Potencial biotecnológico de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos**

Fungos do grupo dos ascomicetos (filo Ascomycota) têm sido descritos como produtores de lacase (Baldrian, 2006), incluindo representantes do gênero *Penicillium*, os quais podem produzir enzimas com características diferentes das produzidas pelos basidiomicetos (filo Basidiomycota), como por exemplo, atividades em altas temperaturas (Tuomela et al., 2000). A atividade de lacase já foi relatada para *Penicillium chrysogenum* (Rodriguez et al., 1996); *P. simplicissimum* (Liu et al., 2008); *P. aculeatum*; *P. digitatum* e *P. cyclopium* (El-Shora et al., 2008); bem como em espécies não conhecidas do gênero *Penicillium* (Gou et al., 2009).

Representantes do gênero *Trichoderma* também são conhecidos produtores de lacase (Holker et al., 2002; Wanh e Ng, 2004; Verma et al., 2004), e participam de processos de biorremediação que envolvem a atividade da lacase, como no tratamento de compostos fenólicos (Chakroun et al., 2009) e na descoloração de corantes e efluentes industriais (Sadhasivam et al., 2009).

A atividade em conjunto de LiP e MnP tem sido reportada na literatura, principalmente em estudos de biorremediação (Hofrichter et al., 2001; Novotný et al., 2004). Diferentemente da lacase, a atividade das enzimas MnP e LiP foram menos investigadas em ascomicetos. Contudo, conforme Lopez et al. (2007), estes micro-organismos representam o segundo grupo mais importante na degradação da madeira, depois dos fungos basidiomicetos. A degradação de poluentes ambientais envolvendo a atividade de LiP e MnP por fungos ascomicetos já foi reportada, principalmente relacionada ao tratamento de efluentes de destilaria (Pant e Adholeya, 2007), descoloração de corantes (Shedbalkar et al., 2008; Khelifi et al., 2009) e biorremediação de ambientes impactados por HPAs (Capotorti et al., 2004; Potin et al., 2004; Baborová et al., 2006; Chulalaksanukul et al., 2006).

Dados relacionados com a atividade de enzimas ligninolíticas por fungos do filo Zygomycota são escassos na literatura (Nagarathnamma e Bajpai, 1999; Kiiskinen et al., 2004; Léon-Santiesteban et al., 2008, Arora e Sharma, 2009). No presente trabalho, o fungo identificado como *Mucor* sp. apresentou atividade para as enzimas LiP e MnP, sendo o primeiro representante do gênero *Mucor* relatado como ligninolítico.

São poucos os estudos relacionados à atividade das enzimas ligninolíticas por fungos derivados marinhos em comparação com fungos terrestres. Entretanto, alguns trabalhos vêm evidenciando a capacidade dos fungos marinhos na produção destas enzimas, bem como na potencial aplicação destes fungos em processos de degradação de poluentes ambientais (Raghukumar et al., 1994; Pointing et al., 1998; Raghukumar et al., 2002; D'Souza et al., 2004;

D'Souza et al., 2006; Raghukumar, 2008, D'Souza et al., 2009), incluindo a descoloração e destoxificação de corantes sintéticos e a biorremediação de áreas impactadas por HPAs, como é o caso dos derramamentos de petróleo nos oceanos.

Uma das principais características dos HPAs é a baixa solubilidade em água, o que dificulta o processo de biorremediação. A aplicação de biosurfactantes tem sido considerada uma interessante alternativa para o aumento da solubilidade dos HPAs, resultando em uma maior degradação destes poluentes no ambiente impactado. Neste sentido, micro-organismos capazes de produzir biosurfactantes são alvos de investigação científica.

De acordo com a literatura, tensões na faixa de 35 mN/m a 40 mN/m, indicam que o micro-organismo é promissor na produção de biosurfactantes (Silva e Tapia, 2002), contudo para ser considerado como biosurfactante o composto, além da redução da tensão superficial deve possuir alta capacidade emulsificante. Apesar dos fungos isolados de cnidário marinhos estudados no presente trabalho não apresentarem atividade emulsificante, a procura por novos biosurfactantes capazes de substituir os seus homólogos produzidos através da síntese química vêm crescendo, em especial, os biosurfactantes produzidos por micro-organismos marinhos para aplicação em processo de biorremediação de ambientes salinos contaminados com petróleo bruto (Maneerat, 2005).

Os isolados associados a cnidários marinhos estudados no presente trabalho foram avaliados também quanto à capacidade de descoloração do corante RBBR por da Silva et al., (2008), sendo os fungos mais eficientes para a descoloração do corante o *Penicillium citrinum* (20.1), *Aspergillus sulphureus* (8.2A), *Cladosporium* sp. (78.1) e *Trichoderma* sp. (12.5b1). Além disso, Passarini (2008) avaliou a degradação de pireno e benzo[a]pireno por treze isolados selecionados no experimento de descoloração do RBBR (da Silva et al., 2008). Os resultados revelaram que sete fungos apresentaram degradação satisfatória destes HPAs, destacando os isolados *Aspergillus sulphureus* (8.2A), *Cladosporium* sp. (78.1) e *Mucor* sp. (6.5) (re-

classificados por Bonugli-Santos et al., 2010 como *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847). Os isolados selecionados como eficientes na descoloração do RBBR por da Silva et al., (2008) e na degradação de HPAs por Passarini (2008) foram os mesmo isolados que apresentaram atividades significativas para pelo menos uma das enzimas ligninolíticas avaliadas no presente trabalho (Tabela 5), sugerindo uma possível atuação destas enzimas nos processos de descoloração e/ou degradação de poluentes ambientais. Estes isolados encontram-se depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

**Tabela 5.** Potencial biotecnológico dos isolados associados a cnidários marinhos selecionados pelo presente trabalho e co-relacionados com os estudos de da Silva et al., (2008) (descoloração do corante RBBR) e Passarini, (2008) (degradação de HPAs).

Fungo	Número CBMAI	Potencial Biotecnológico		
		Descoloração do corante RBBR	Degradação de HPAs	Atividade ligninolítica
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> (8.2 A)	849	+++	Pireno e Benzo [a] pireno	Lacase, MnP e LiP
<i>Trichoderma</i> sp. (12.5B1)	852	++	Pireno e Benzo [a] pireno	LiP
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (78.1)	857	+++	Pireno e Benzo [a] pireno	Lacase, MnP e LiP
<i>Penicillium citrinum</i> (32.2)	ND	-	-	Lacase, MnP e LiP
<i>Penicillium citrinum</i> (20.1)	853	++++	Pireno e Benzo [a] pireno	Lacase, MnP e LiP
<i>Mucor racemosus</i> (6.5)	847	+	Pireno e Benzo [a] pireno	MnP e LiP

ND= Não depositado

Atividade de descoloração: ++++Ótima, +++Boa, ++Média, + pouca e - nula

## 5. CONCLUSÕES

A abordagem utilizada para a caracterização de fungos associados aos cnidários marinhos foi aplicada com sucesso, visto que, a avaliação do polimorfismo genético pelo método de ARDRA e os resultados combinados das análises taxonômicas moleculares e

convencionais permitiram o conhecimento da diversidade de fungos derivados de invertebrados marinhos da costa brasileira.

Tendo em vista os significativos resultados obtidos para a atividade ligninolítica, os fungos derivados marinhos podem ser considerados altamente promissores para aplicações biotecnológicas. Em adição, a produção de lacase, MnP e LiP no meio com 3% de NaCl, estimulam a realização de novos estudos visando à utilização destas enzimas em ambientes ou processos salinos. Neste contexto, os fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847, os quais apresentaram capacidade de descoloração do corante RBBR (da Silva et al. 2008) , degradação de HPAs (Passarini, 2008) e, no presente trabalho, atividade ligninolítica em meio contendo sal, podem ser considerados fontes de recursos genéticos para a biorremediação de poluentes em águas e sedimentos marinhos, bem como para o tratamento de efluentes de indústrias têxteis, os quais apresentam elevada salinidade.



## REFERÊNCIAS

- Aro, N., Pakula, T., Penttila, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 719–739, 2005.
- Arora, D.S., Gill, P.K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 28: 602–605, 2001.
- Arora, D.S., Sharma, R.K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. In press: DOI 10.1007/s12010-009-8676-y, 2009.
- Baborová, P.; Möder, M.; Baldrian, P.; Cajthamlová, K.; Cajthaml, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*. 157: 248-253, 2006.
- Baldrian, P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters*. 30: 215-242, 2006.
- Baker, P.W., Kennedy, J., Dobson, A.D.W., Marchesi, J.R. Phylogenetic Diversity and Antimicrobial Activities of Fungi Associated with *Haliclona simulans* Isolated from Irish Coastal Waters. *Marine Biotechnology*. 11:540–547, 2009.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger Jr, W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*. 160: 249-255, 2005.
- Bugni, T.S., Ireland, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*. 21: 143 - 163, 2004.
- Bumann, D., Jarm, G. Localization of digestion activities in polyps of *Nausithoe planulophora* and *Thecoscyphus zibrowii* (Coronatae, Scyphozoa, Cnidaria). *Helgoland Marine Research*. 51: 477-485, 1998.

- Buswell, J.K., Cai, Y.J., Chang, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. 128: 81-88, 1995.
- Capotorti, G.; Digiannvincenzo, P.; Cesti, P.; Bernardi, A.; Guglielmetti, G. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation*. 15: 79–85, 2004.
- Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M.J., Dhouib, A., Sayadi, S. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*. In press, doi:10.1016/j.procbio. 2009.11.009.
- Chulalaksananukul, S.; Gadd, G. M.; Sangvanich, P.; Sihanonth, P.; Piapukiew, J.; Vangnai, A. S. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS Microbiology Letters*. 262: 1-99, 2006.
- D'Souza, D.T., Tiwari, R., Sah, A.K. and Raghukumar, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 504-511, 2004.
- D'Souza, D.T., Tiwari, R., Sah, A.K., Raghukumara, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 504–511, 2006.
- D'Souza-Ticlo, D., Sharma, D., Raghukumar, C. A Thermostable Metal-Tolerant Laccase with Bioremediation Potential from a Marine Derived Fungus. *Marine Biotechnology*. (In press) DOI 10.1007/s10126-009-9187-0, 2009.
- Domsch, K.K., Gams, W., Anderson, T.H. *Compendium of soil fungi*. Academic Press, New York, 1980.

- Durán, N., Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 714: 1-17, 2000.
- El-Shora, H.M., Youssef, M.M., Khalaf, S.A. inducers and Inhibitors of Laccase from *Penicillium*. *Biotechnology*. 7: 35-42, 2008.
- Ellis, M.B. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew, UK, 1971.
- Gou, M., Qu, Y., Zhou, J., Ma, F., Tan, L. Azo dye decolorization by a new fungal isolate, *Penicillium* sp. QQ and fungal-bacterial cocultures. *Journal of Hazardous Materials*. 170:314-31, 2009.
- Grishkan, I.; Nevo, E.; Wasser, S.P. Soil micromycete diversity in the hypersaline Dead Sea coastal area, Israel. *Mycological Progress*, v. 2, p. 19-28, 2003.
- Haas, R., Tsivunchyk, O., Steinbach, K., Löw, E.V., Scheibner K., Hofrichter, M. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 564–566, 2004.
- Harayama, S. Poly aromatic hydrocarbons bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 268-273, 1997.
- Hofrichter, M., Lundell, T., Hatakka. A. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (10): 4588-4593, 2001.
- Holker, U., Dohse, J., Hofer, M. Extracellular laccase in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiologica*. 47: 423–427, 2002.
- Holler, U., Wright, A.D., Matthee, G.F., König, G.M., Draeger, D., Aust, H.J., Schulz, B. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*. 104 (11): 1354 – 1365, 2000.

- Hua, J. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy. *Ocean Engineering*. 33: 152–167, 2006.
- Hyde, K.D., Sarma, V.V., Jones, E.B.G. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: *Marine Mycology- A Practical Approach* (eds. K.D. Hyde and S.B. Pointing) Fungal Diversity Research Series 1: 172-204, 2000.
- Johnson, V., Singh, M., Saini, V.S., Adhikari, D.K., Sista, V., Yadav, N.K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology Letters*. 6: 487-490, 1992.
- Khelifi, E., Ayed, L., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*. 163: 1056-1062, 2009.
- Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120, 1980.
- Kiiskinen, L. -L., Rättö, M. and Kruus, K., Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*. 97:640–646, 2004.
- Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. *Marine Micology: The Higher Fungi*. Academic Press, New York, 1979.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*. 169: 247-250, 1984.
- León-Santiesteban, H., Bernal, R., Fernández, F.J., Tomasini, A. Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83:1394–1400, 2008.

- Liu, J-X., Zhou, W-L., Gong, J-L., Tang, L., Zhang, Y., Yu, H-Y., Wang, B., Xu, X-M., Zeng, G-M. An electrochemical sensor for detection of laccase activities from *Penicillium simplicissimum* compost based on carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Bioresource Technology*. 99: 8748-8751, 2008.
- Li, Q., Wang, G. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiological Research*. 164: 233-241, 2009.
- Lopez, M.J., Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 794–800, 2007.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*. In press doi:10.1016/j.biortech.2009.10.087.
- Maneerat, S. Biosurfactants from marine microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 27(6): 1263-1272, 2005.
- Menezes, C. B., Bonugli- Santos R.C., Miqueletto, P.B., Passarini, M.R.Z., Silva, C.H.D., Justo, M.R., Leal, R.R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D., Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*. In press doi:10.1016/j.micres.2009.09.005
- Morrison-Gardiner, S., Dominant fungi from Australian coral reefs. *Fungal Diversity*. 9, 105–121, 2002.
- Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. 133:183 - 198, 2005.

- Nagarathnamma, R., Bajpai, P. Decolorization and Detoxification of Extraction-Stage Effluent from Chlorine Bleaching of Kraft Pulp by *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1078–1082, 1999.
- Novotný, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., Sasek, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1545–1551, 2004.
- O'Donnell, K. *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* ed. Reynolds, D.R. and Taylor, J.W. pp. 225–233. Wallingford, CT: CAB International, 1993.
- Osterhage C. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi. Tese de Doutorado. Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha, 2001.
- Pant, D., Adholeya, A. Identification, Ligninolytic Enzyme Activity and Decolorization Potential of Two Fungi Isolated from a Distillery Effluent Contaminated Site. *Water Air Soil Pollution*. 183: 165–176, 2007.
- Passarini, M.R.Z. Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos. 107 f. Dissertação (Mestrado):Universidade de São Paulo. 2008.
- Pitt, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphs states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. In: Academic Press, London., 1979.
- Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P. and Jones, E.B.G. A qualitative assessment of lignocelluloses degrading activity in marine fungi. *Botanica Marina*, 41:290-298, 1998.
- Potin, O., Rafin, C. and Veignie, E., Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 54: 45–52, 2004.

- Prasannarai, K., Sridhar, K.R. Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. *Current Science*. 81 (3): 304 – 311, 2001.
- Raeder, J.; Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*.1: 17-20, 1985.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'Souza, T.M., Reddy, C.A. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. *Botanica Marina*. 37: 515-523, 1994.
- Raghukumar, C. Bioremediation of coloured pollutants by terrestrial versus facultative marine fungi. In: Fungi in Marine Environment. (ed. K.D. Hyde) Fungal Diversity Research Series 7: 317-344, 2002.
- Raghukumar, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity*. 31: 19-35, 2008.
- Rodriguez, A., Falcon, M.A., Carnicero, A., Perestlo, F., Fuent, G. D., Trojanowski, J. Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45: 399–403, 1996.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. Redox-mediated decolorization of recalcitrant textile dyes by *Trichoderma harzianum* WL1 laccase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:1733–1741, 2009.
- Shedbalkar, U., Dhanve, R., Jadhav, J. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *Journal of Hazardous Materials*. 157: 472-479, 2008.
- Shigemori, H., Kasai, Y., Komatsu, K., Tsuda, M., Mikami, Y., Kobayashi, J. Sporiolides A and B, new cytotoxic twelve-membered macrolides from a marine-derived fungus *Cladosporium* species. *Marine Drugs*. 2: 164-169, 2004.

- Da Silva, M., Passarini, M.R.Z., Bonugli, R.C., Sette, L.D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*. 29: 1331-1339, 2008.
- Silva, W.O., Tapia, Y.I.P. Produção de biosurfactantes, Desenvolvimento de bioprocessos. Deb, Eq, UFRJ, 2002.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599, 2007.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D., Wagner, M. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 295-347, 2007.
- Thompson, J.D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., Clustal, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680, 1994
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. 72: 169-183, 2000.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Sahai, V., Prévost, D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme Microbiol Technology*. 41, 764–771, 2007.
- Wang, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33: 545–551, 2006.
- Wang, G., Li, Q., Zhu, P. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93:163-174, 2008.



- Wanh, H.X., Ng, T.B. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315: 450–454, 2004.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22:161-187, 2003.
- Willumsen, P.A., Karlson, V. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 7: 415-423, 1997.

## CAPÍTULO 2. PRODUCTION OF LACCASE, MANGANESE PEROXIDASE AND LIGNIN PEROXIDASE BY BRAZILIAN MARINE-DERIVED FUNGI

Rafaella C. Bonugli-Santos<sup>1,2</sup>, Lucia Regina Durrant<sup>1</sup>, Manuela da Silva<sup>3</sup>, Lara Durães Sette<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food Science Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP) P.O. Box 6121, CEP 13083-862, SP, Brazil

<sup>2</sup> National Institute for Health Quality Control, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup> Microbial Resource Division - CPQBA, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6171, CEP 13081-970 Paulinia, SP, Brazil

**Este capítulo é baseado no artigo original publicado na revista *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (1): 32-37, 2010**

### ABSTRACT

Marine-derived fungi are a potential for the search of new compounds with relevant features. Among these, the ligninolytic enzymes have potential applications in a large number of fields, including the environmental and industrial sectors. This is the work aimed to evaluate the enzymatic activities of three marine-derived fungi (*Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 and *Mucor racemosus* CBMAI 847) under different carbon sources and salinity conditions by using statistical experimental design. MnP, LiP and laccase were detected when these fungi were cultured in malt extract, however when grown on basal medium containing glucose and wheat bran LiP was not detected and yet an increase in MnP and laccase was observed. Statistical analysis through surface responses was performed and results showed high values of MnP and laccase activities under 12.5% and 23% (w/v) salinity, highlighting the potential use of these fungi for industrial applications and in bioremediation of contaminated sites having high salt concentrations. The highest values for LiP (75376.34 UI L<sup>-1</sup>), MnP (4484.30 IU L<sup>-1</sup>) and laccase (898.15 UI L<sup>-1</sup>) were obtained with the fungus *M. racemosus* CBMAI 847 and it is the first report concerning ligninolytic enzymes production by a zygomycete from this genus.

**Keywords:** Marine-derived fungi, ligninolytic enzymes, salinity conditions and statistical experimental design

## 1. INTRODUCTION

Marine-derived fungi are able to produce biologically active secondary metabolites different from those produced by their terrestrial counterparts because they are adapted to the salinity found in marine environments (Bugni and Ireland, 2004; Saleem et al., 2007). However, only recently this group of microorganisms has attracted attention as potential source of new generation of natural products and in biodegradation process [da Silva et al., 2008]. In this context, the study of extracellular enzymes production by these microorganisms is very important in applied biotechnology. Among the extracellular enzymes produced by filamentous fungi the ligninolytic system is of great significance in environmental remediation, a process in which biological systems are used to degrade or neutralize pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a major class of hazardous contaminants that pose a potential health risk because of their detrimental biological effects (Dúran and Esposito, 2000; Arun et al., 2008). In addition, these enzymes have potential applications in a large number of fields, including the chemical, fuel, food, agricultural, paper, textile and cosmetic industrial sectors (Gianfreda and Rao, 2004; Eibes et al., 2005; Lopez et al., 2007; Sette et al., 2008) . Lignin peroxidase (LiP) (E.C:1.11.1.14), manganese-dependent peroxidase (MnP) (E.C:1.11.1.13) and laccase (Lac) (E.C:1.10.3.2) are the three major lignin-degrading enzymes with great potential for industrial applications (D'Souza et al., 2006).

Laccase is an enzyme that contains copper in its active site, however lignin peroxidase (LiP) and manganese-dependent peroxidase or manganese peroxidase (MnP) contain Fe as group prostetic. LiP is a heme protein with a high oxidation potential and can oxidize phenolic and non-phenolic substrates. This enzyme was firstly characterized by Tien and Kirk (1984). MnP is a glycoprotein dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that requires Mn<sup>2+</sup> to oxidize monoaromatic phenols and aromatic dyes (1984). Laccase is a multicopper oxidase that catalyzes the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and oxidizes aromatic amines (D'Souza et al., 2006).

Different groups of fungi have been reported as producers of ligninolytic enzymes (Cullen, 1997; Gianfreda and Rao, 2004). Among them, the white-rot fungi have received extensive attention due to their powerful production of these enzymes (Martinez et al., 2005). However, there is little information in the literature regarding ligninolytic enzymes production by marine-derived fungi (Cullen, 1997; Raghukumar et al., 1999; Raghukumar et al., 2006). Although the ligninolytic system is frequently produced during fungal secondary metabolism, different microorganisms produce different enzymes depending on cultivation conditions (Gianfreda et al., 1999; Nyanhongo et al., 2002). Statistically based experimental designs provide an efficient approach to help determine the best culture conditions for maximizing enzyme production that in turn can lead to process optimization [Nyanhongo et al., 2003; Levin and Forchiassin, 2005; Macedo et al., 2008]. Within this context, three marine-derived filamentous fungi *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 and *Mucor racemosus* CBMAI 847, isolated from cnidarians samples collected in the northern coast of the state of São Paulo, Brazil and previously selected for their capacity to tolerate/decolorize Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye (da Silva et al., 2008), were investigated regarding MnP, LiP and lacase production under different carbon sources and salinity concentrations, features considered strategically important, especially for the use of these enzymes in high salt concentrations conditions.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Marine-derived filamentous fungi**

The filamentous fungi *A. sclerotiorum*, *C. cladosporioides* and *M. racemosus* used in this work were isolated from the Brazilian cnidarian *Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* and *Mussismilia hispida*, respectively, collected in the town of São Sebastião, northern coast of the state of São Paulo, Brazil. These fungi were previously selected for their capacity to

decolorize/tolerate RBBR dye as reported by da Silva et al., (2008). The cnidarian-derived fungi used in the present study are deposited in the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms—CBMAI (Table 1).

## **2.2. Taxonomic characterization of marine-derived filamentous fungi and phylogenetic analyses**

The three marine-derived fungi were preliminary characterized according to da Silva et al. (2008). However, in the present study the ITS-rDNA sequences for the fungal strains were obtained and used in order to establish their phylogenetic relationship. Genomic DNA was extracted from cultures as described by (Raeder and Broda, 1985). The ITS1-5.8S-ITS2 regions were amplified with the primers ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). PCRs were performed in final reaction mixtures (25  $\mu$ L) containing 5–25 ng genomic DNA, 0.4  $\mu$ M of each primer, 0.2  $\mu$ M dNTPs (GE Healthcare), 1.5 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2.0U Taq polymerase (Invitrogen) and 1.0 $\times$  reaction buffer (Invitrogen). Amplification reactions were performed with the following cycling conditions: initial denaturation for 5 min at 94 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 1 min at 72 °C with a final extension for 10 min at 72 °C and cooling to 4 °C. Amplified products were purified, quantified and subjected to sequencing according to Sette et al., (2005) by using the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for an automated MegaBace sequencer (GE Healthcare). The sets of primers used for sequencing were ITS1 and ITS4.

Sequences were compared with ITS-rDNA sequence data from strains available at the public databases Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and CBS Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl/fungi/BioLoMICSSequences.aspx>) by using the BLAST N sequence match routines. The sequences were aligned using the CLUSTAL X program (Thompson et al., 1994) and phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA

version 4.0 (Tamura et al., 2007). The Kimura two-parameter model (Kimura, 1980) was used to estimate evolutionary distance. The phylogenetic reconstruction was done using the neighbor-joining (NJ) algorithm, with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs, using the software routines included in the MEGA software. The nucleotide sequences of the marine-derived fungi determined in this study have been deposited in the GenBank under the accession numbers shown in Table 1.

### **2.3. Activity of ligninolytic enzymes in liquid media**

To determine the production of the three major ligninolytic enzymes: lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase the fungi *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857 and *M. racemosus* CBMAI 847 were cultured in 2% (w/v) malt extract agar plus 3% (w/v) NaCl for 7 days at 28 °C. Following the incubation three fungal culture plugs (0.5 cm diameter) taken from the edge of the colony were transferred to 200 ml erlenmeyer flasks containing 100 ml 2% (w/v) malt extract broth plus 3% (w/v) NaCl (in duplicate). The flasks were incubated for 7 days at 140 rpm and 28 °C. Cultures were harvested by filtration and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min (Eppendorf Centrifuge 5804R) and the supernatant used as enzyme source. A second set of tests was performed with experimental design using a basal medium containing 0.10 g glucose; 0.15 g yeast extract; 0.05 g NH<sub>4</sub>Cl; and NaCl and wheat bran as variable parameters (Table 3) using the same conditions (volume of medium, temperature and shaking) described above. The carbon source glucose and wheat bran were chosen according to the literature, where glucose has been cited as one of the most efficient carbon source for ligninolytic enzyme production (Papinutti et al., 2003; Niladevi and Prema, 2008; Elisashvili et al., 2009) and wheat bran as a ligninolytic system inductor (Souza et al., 2006).

Additional and confirmative analyses were conducted for *M. racemosus* CBMAI 847, since statistically significant results were obtained for MnP production. In this case, the concentration of wheat bran was set as 4.5 mg ml<sup>-1</sup> and the variation of salinity was between 0.5% (w/v) and 25% (w/v), then the salinity was set as 0.5% (w/v) and the variation of wheat bran at 0.5 mg ml<sup>-1</sup> and 7.5 mg ml<sup>-1</sup>. Experiments were run in triplicate.

#### **2.4. Time course for MnP produced by *Mucor racemosus***

MnP production by *M. racemosus* CBMAI 847 was followed for 15 days. The fungus was inoculated into 100 ml erlenmeyer flasks containing 50 ml basal medium containing 0.5 g glucose; 0.075 g yeast extract; 0.025 g NH<sub>4</sub>Cl; 6.25 g NaCl [12.5% (w/v) salinity] supplemented with wheat bran 2.4 mg ml<sup>-1</sup>. Experiments were run in duplicate.

#### **2.5. Enzymes assays**

All enzyme activities were measured spectrophotometrically (Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japan). Laccase activity was determined using 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline) (ABTS) according to (Buswell et al., 1995). The mixture was composed by 0.1 ml sodium acetate buffer 0.1M (pH 5.0), 0.8 ml ABTS solution 0.03% (w/v) and 0.1 ml enzyme solution. The ABTS oxidation was measured by monitoring the increase in absorbance at 420 nm.

MnP activity was measured by phenol red oxidation method at 610 nm (Kuwahara et al., 1984). The reaction mixture was composed by 500 µL enzymatic extract, 100 µL phenol red (0.01%, w/v), 100 µL sodium lactate (0.25 M), 200 µL albumin bovine (0.5%, w/v), 50 µl MnSO<sub>4</sub> (2 mM), 50 µl hydrogen peroxide in sodium succinate buffer (20mM, pH 4.5). The mixture was incubated at 30 °C for 5min and the reaction was interrupted by the addition of 40 µL NaOH (2N).

LiP activity was determined by the oxidation of veratryl alcohol as described by Arora and Gill, (2001). The mixture reaction was composed by 1ml sodium tartrate buffer 125 mM pH 3.0, 500  $\mu$ L veratryl alcohol 10mM; 500 $\mu$ L hydrogen peroxide 2 mM and 500 $\mu$ L enzyme extract. The reaction was started by adding hydrogen peroxide and the appearance of veratraldehyde was determined at 310 nm.

One enzyme unit was defined as 1.0  $\mu$ mol product formed per minute under the assay conditions.

## **2.6. Experimental design**

The 2<sup>2</sup> statistical experimental design, central composite design (CCD), with a star configuration (four axial points) and three central points, totalizing 11 experiments have been employed to increase culture conditions for maximal activity (Table 3). These experiments were carried out to obtain a second-order model, in order to predict the ligninolytic activity and productivity as functions of salinity and concentration of wheat bran. All the experiments were conducted in a randomized way. The distances of the axial points<sup>27</sup> were  $\pm 1.41$ , calculated by the equation:

$$\alpha = (2n)^{1/4} \quad (1)$$

where  $\alpha$  is the distance of the axial points and n is the number of the independent variables. The data were treated with the aid of STATISTICA 5.5 from Statsoft Inc. (2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74 104, USA). This software also generated response surface plots. The quality of the fit of the second-order model equation was expressed by the coefficient of determination R<sup>2</sup>, and its statistical significance was determined by an F test (analysis of variance—ANOVA).



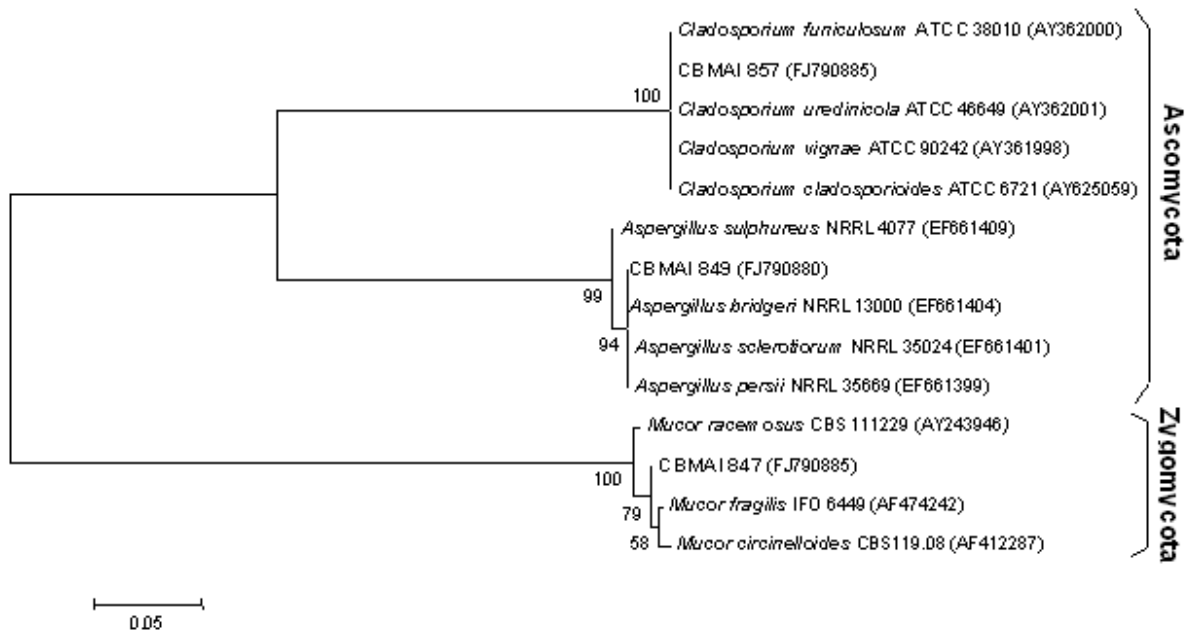
### 3. RESULTS

Marine-derived fungi selected by their capacity to tolerate/ decolorize RBBR dye (da Silva et al., 2008) used in the present study were characterized taxonomically by molecular and conventional methods. Data derived from morphology, BLAST (Table 1) and phylogenetic analyses (Fig. 1) identified these fungi as *A. sclerotiorum* (99% BLAST similarity, Table 1), *C. cladosporioides* (99% BLAST similarity, Table 1) both representatives of the Ascomycota phylum and *M. racemosus* (97% BLAST similarity, Table 1), phylum Zygomycota.

**Table 1.** Marine-derived fungi identification and data from sampling, isolation and accession numbers.

CBMAI Accession Number	GenBank Accession Number	Coral Source (Sampling Site)	Molecular Identification BLAST Similarity	Molecular and Morphological Identification
847	FJ790879	<i>Mussismilia hispida</i> (Praia Portinho)	97% <i>Mucor racemosus</i> CBS111229 97% <i>Mucor fragilis</i> IFO6449 95% <i>Mucor circinelloides</i> CBS11908	<i>M. racemosus</i>
849	FJ790880	<i>Palythoa variabilis</i> (Praia Portinho)	99% <i>Aspergillus bridgeri</i> NRRL13000 99% <i>Aspergillus sclerotiorum</i> NRRL35054 99% <i>Aspergillus persii</i> NRRL35669 98% <i>Aspergillus sulphureus</i> NRRL4077	<i>A. sclerotiorum</i>
857	FJ790885	<i>Palythoa caribaeorum</i> (Praia Preta)	99% <i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC6721 99% <i>Cladosporium vigneae</i> ATCC90242 99% <i>Cladosporium funiculosum</i> ATCC38010 99% <i>Cladosporium uredinicola</i> ATCC46649	<i>C. cladosporioides</i>

\* source: da Silva et al. (2008)



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on ITS analyses showing closest relatives of marine-derived fungi isolates (Kimura two-parameter model; neighbor-joining algorithm and 1000 replicate bootstrap).

Initial experiments concerning ligninolytic enzymes production were performed by growing the marine-derived fungi in malt extract 2% (w/v) plus 3% (w/v) NaCl that was then medium used for fungi isolation from the marine invertebrates (da Silva et al., 2008). In these conditions *M. racemosus* CBMAI 847 produced 75376.34UL<sup>-1</sup> of LiP and 2600.90 UL<sup>-1</sup> of MnP, although no laccase activity was detected. *A. sclerotiorum* CBMAI 849 showed 17956.99UL<sup>-1</sup> of Lip, 2511.21 UL<sup>-1</sup> of MnP and 9.26 UL<sup>-1</sup> of laccase and *C. cladosporioides* CBMAI 857 presented 17419.35 of LiP, 4394.62 UL<sup>-1</sup> of MnP and not detectable levels of laccase (Table 2).

**Table 2.** Ligninolytic activities in malt extract 2% (w/v) plus 3% (w/v) NaCl.

Isolates	LiP (UL <sup>-1</sup> )	MnP (UL <sup>-1</sup> )	Lac (UL <sup>-1</sup> )
<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849	17956.99	2511.21	9.26
<i>C. cladosporioides</i> CBMAI 857	17419.35	4394.62	2.31
<i>M. racemosus</i> CBMAI 847	75376.34	2600.90	0.000

These three fungi were then submitted to the statistical experimental design (CCD) by growing them on basal medium containing glucose as carbon source, besides wheat bran and salt as variable parameters to be evaluated regarding their influence on enzymatic activities (Table 3). Under these conditions, LiP was not produced. However, *M. racemosus* CBMAI 847 presented satisfactory increase in the laccase and MnP activities. For this strain, MnP activities varied from 1076.2 UL<sup>-1</sup> (run 3) to 4484.3 UL<sup>-1</sup> (run 7) and the laccase activities from 9.26 UL<sup>-1</sup> (run 10 and 11) to 898.15 UL<sup>-1</sup> (run 6). In the case of *A. sclerotiorum* CBMAI 849, laccase was produced in low levels and had the highest MnP activity, 3228.7UL<sup>-1</sup> (run 8), whereas *C. cladosporioides* CBMAI857 showed 3139.0 UL<sup>-1</sup> (run 10) of MnP and 203.70 UL<sup>-1</sup> (run 7) of laccase production. In general, when the three marine-derived fungi were cultured in 12.5% (w/v) salinity higher activity of MnP and laccase were observed. However, *M. racemosus* CBMAI847 presented high MnP values (4394.62 UL<sup>-1</sup>) in 5% of salinity (run 1) and high amounts of laccase (898.15 UL<sup>-1</sup>) in 23% of salinity. Overall, it was not possible to establish the influence of wheat bran in MnP and laccase production since these enzymes were obtained in low (2.4 mg ml<sup>-1</sup> and 3.0 mg ml<sup>-1</sup>, runs 1, 2 and 7), medium (4.5 mg ml<sup>-1</sup>, run 6) and high (6.0 mg ml<sup>-1</sup> and 6.6 mg ml<sup>-1</sup>, runs 4 and 8) wheat bran concentrations. However, the highest productions of MnP (4394.62 UL<sup>-1</sup>, run 1 and 4484.30 UL<sup>-1</sup>, run 7) by *M. racemosus* CBMAI 847 were obtained in low wheat bran concentrations (2.4mgml<sup>-1</sup> and 3.0mgml<sup>-1</sup>), while good MnP activities (above 3000.0 UL<sup>-1</sup>) were achieved by *A. sclerotiorum* CBMAI 849 in 2.4 mg ml<sup>-1</sup> (run

7) and 6.6 mg ml<sup>-1</sup> (run 8) wheat bran concentrations and by *C. cladosporioides* CBMAI 857 in 4.5 mg ml<sup>-1</sup> (run 10) of wheat bran.

**Table 3.** Central composite design matrix with the real and coded values (in parentheses) for laccase and MnP activity

Run	Salinity (%)	Wheat bran (mg ml <sup>-1</sup> )	<i>A. sclerotiorum</i> CBMAI 849		<i>M. racemosus</i> CBMAI 847		<i>C. cladosporioides</i> CBMAI 857	
			Laccase (UL <sup>-1</sup> )	MnP (UL <sup>-1</sup> )	Laccase (UL <sup>-1</sup> )	MnP (UL <sup>-1</sup> )	Laccase (UL <sup>-1</sup> )	MnP (UL <sup>-1</sup> )
1	5 (-1)	3.0 (-1)	0.00	1524.66	23.15	4394.62	0.00	896.86
2	20 (+1)	3.0 (-1)	0.00	1255.61	37.04	1165.92	0.00	896.86
3	5 (-1)	6.0 (+1)	0.00	1255.61	18.52	1076.23	0.00	0.00
4	20 (+1)	6.0 (+1)	0.00	179.37	0.00	2600.90	0.00	538.12
5	2 (-1.41)	4.5 (0)	9.26	1345.29	27.78	1165.92	101.85	358.74
6	23 (+1.41)	4.5 (0)	0.00	1255.61	898.15	1165.92	4.63	986.55
7	12.5 (0)	2.4 (-1.41)	9.26	3139.01	0.00	4484.30	203.70	1076.23
8	12.5 (0)	6.6 (+1.41)	0.00	3228.70	245.37	1524.66	0.00	1704.04
9	12.5 (0)	4.5 (0)	9.26	1704.04	13.89	1165.9	41.67	2331.84
10	12.5 (0)	4.5 (0)	13.9	1973.09	9.26	1524.7	32.41	3139.01
11	12.5 (0)	4.5 (0)	13.9	2062.78	9.26	1524.7	32.41	2421.52

*A. sclerotiorum* CBMAI 849 and *C. cladosporioide* CBMAI 857 did not show any statistically significant variable in the regression coefficient for the model that predicts laccase and MnP activities. However, *M. racemosus* CBMAI 847 showed statistically significant results ( $p < 0.05$ ) for MnP activities with the following variables: linear and quadratic terms for wheat bran and interaction salinity × wheat bran (Table 4).

**Table 4.** Regression coefficient for *M. racemosus* CBMAI 847 MnP activity.

Factor	Regression coefficient	Standard error	t-value	p-value
Mean	1405.1	284.22	4.943	0.0043
Salinity (L)	-213.00	174.05	-1.228	0.2275
Salinity (Q)	-63.55	207.16	-0.307	0.7714
Wheat bran (L)	-758.61	174.05	-4.358	0.0073*
Wheat bran (Q)	855.75	207.16	4.130	0.0091*
Salinity x wheat bran	1188.3	246.15	4.828	0.0048*

\*significant factors (p<0.05); L = Linear; Q = Quadratic

Based on the results above (regression coefficient) a second order model Eq. (2) describing MnP activities for *M. racemosus* CBMAI 847 as a function of salinity and wheat bran was established as follows:

MnP activity = 1345.3 – 758.6 wheat bran + 874.5 wheat bran<sup>2</sup> + 1188.4 salinity by wheat bran (2)

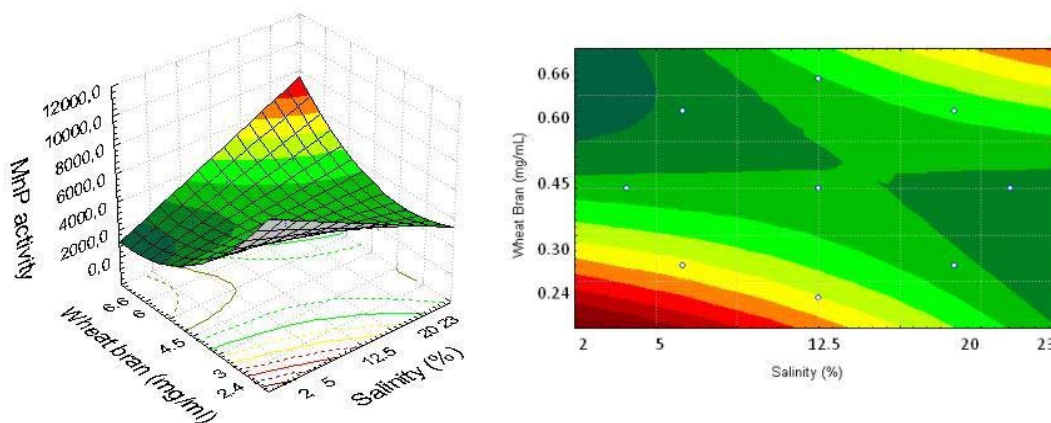
The statistical significance (Table 5) was checked by an F test (ANOVA). As the F test value (21.9) for the regression was highly significant [higher than the F tabulated (4.35)], and the percentage of variation explained by the model was suitable (R<sup>2</sup> = 91%), the model could be considered to be predictive and was therefore used to generate a contour plot and response surface (Fig. 2).

**Table 5.** ANOVA of the quadratic model for MnP activity (UI/L) by marine-derived fungus *M. racemosus* CBMAI 847

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F test*
Regression	149795	3	4993	21.9
Residual	159752	7	2282	
Total	16577.1	10		

Coefficient of determination (R<sup>2</sup>) = 91% and p-value 0.0001, \*F 0.05; 3; 7 (ftabulated) = 4.35

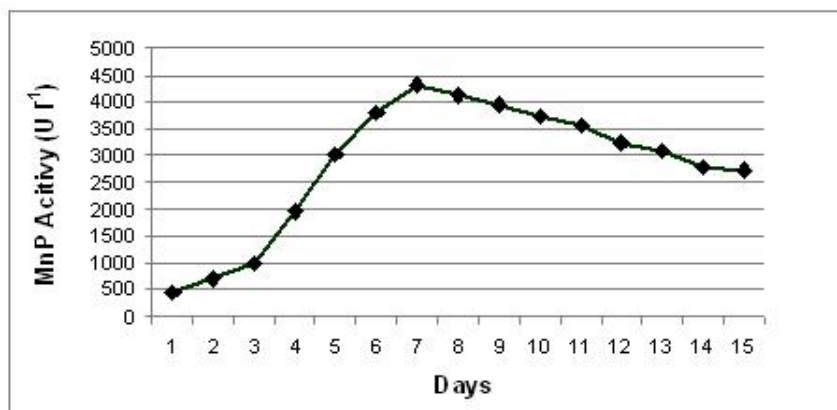
Data derived from the response surface showed that there was an increase in activity under low salinity and low wheat bran concentration and under high salinity concentration (Fig. 2). To confirm this situation the second test proposed (data not shown) fixed firstly the wheat bran concentration at the average level ( $4.5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) and varied the salinity (0.5% and 25%, w/v) and then the salinity was fixed (5%, w/v) and the concentration of wheat bran was varied ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  and  $7.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Results from this experiment showed that MnP was five times lower in high ( $7.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $358.74 \text{ UL}^{-1}$ ) wheat bran concentration than that found in low wheat bran concentration ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $1883.41 \text{ UL}^{-1}$ ). Additionally, under 0.5% of salt and  $4.5 \text{ mg ml}^{-1}$  of wheat bran MnP was not detected. This result suggests that high amounts of wheat bran could negatively affect the MnP production and that salt could be an important compound for this enzyme production by marine-derived fungus *M.racemosus* CBMAI 847. This fungus showed the best results for LiP ( $75376.34 \text{ UL}^{-1}$ ), MnP ( $4484.30 \text{ UL}^{-1}$ ) and laccase ( $898.15 \text{ UL}^{-1}$ ) production achieved in the present work. According to the consulted literature, there have been no reports on ligninolytic enzyme production by fungi from the genus *Mucor*.



**Fig. 2** Contour curve and response surface for the MnP activity of *M. racemosus* CBMAI 847 as a function of: salinity (%) versus wheat bran, according to the CCD.

Time course for MnP produced by *M. racemosus* was performed in order to evaluate the maximum enzyme activity during 15 days by using 12.5% (w/v) of salinity and  $2.4 \text{ mg ml}^{-1}$  of

wheat bran. The highest MnP activity ( $4304.9 \text{ UL}^{-1}$ ) occurred during the 7<sup>th</sup> day (Fig. 3) and the amount of enzyme detected corroborates the data derived from the statistical experimental design (Table 3).



**Fig. 3.** Time course for MnP activity produced by *M. racemosus* CBMAI 847

#### 4. DISCUSSION

The production of ligninolytic enzymes by marine-derived fungi has been scarcely investigated. In the present work, the fungi *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857 and *M. racemosus* CBMAI 847 isolated from marine cnidarians were able to produce ligninolytic enzymes and showed particular response to the different conditions of carbon sources and salinity. It has been previously shown that carbon sources, nitrogen and other nutrients concentrations can influence the ligninolytic enzymes production (Nyanhongo et al., 2002; Papinutti et al., 2003; Papinutti and Forchiassin, 2003; Gianfreda and Rao, 2004; Niladevi and Prema, 2008; Levin et al., 2008; Kamei et al., 2008).

LiP production was favored when 2% (w/v) malt extract plus 3% (w/v) NaCl was used as culture medium, whereas when the fungi were cultivated in glucose supplemented with wheat bran in different salinity conditions (2%, 5%, 12.5%, 20% and 23%, w/v) LiP was not detected and highest amounts of MnP and laccase were observed. The absence of LiP in the experiments suggests that wheat bran could negatively affect this activity, since when glucose was only used as carbon source good production of ligninolytic enzymes has been showed in

the literature. On the other hand, also based on literature, the presence of wheat bran seemed to induce MnP and laccase production while inhibiting LiP production (Ahammed and Prema, 2002; Papinutti et al., 2003; Souza et al., 2006). The negative influence of salt in LiP activity was excluded, since in the malt extract medium containing 3% of salinity LiP was produced in great amounts, whereas in the basal medium with glucose supplemented with wheat bran under 2% of salinity LiP was not detected. In the present work, the best ligninolytic enzyme activities were obtained with the zygomycete fungus *M. racemosus* CBMAI 847. It is important to highlight that this is the first time LiP, MnP and laccase production by a zygomycete from the genus *Mucor* is reported. There are only few studies in the literature about ligninolytic enzymes production by marine-derived fungi (Raghukumar et al., 1999; D'Souza et al., 2006; Kamei et al., 2008) and the amounts of LiP (50.0 UL<sup>-1</sup>) and MnP (600.0–1600.0 UL<sup>-1</sup>) reported by these studies were considerably lower than those found in the present experiments. Meanwhile, similar amounts of laccase (~900.00 UL<sup>-1</sup>) have already been reported.

Data derived from CCD experiments (Table 4 and Fig. 1) suggest that MnP production by *M. racemosus* CBMAI847 is probably related to salt concentrations, since the highest value were obtained with 5% and 12.5% (w/v) of salinity (Table 3 and Fig. 2) and no MnP was detected when 0.5% (w/v) of salt was used (confirmative experiment).

In a recent study, Kamei et al. (2008) showed that higher activity of MnP was observed in the nitrogen limited medium containing 3% (w/v) sea salts than that in the medium without salt. On the other hand, in low concentrations (2.4 mg ml<sup>-1</sup> and 3.0 mg ml<sup>-1</sup>) of wheat bran best results regarding MnP activity were achieved for this fungus.



The ability of the fungus *M. racemosus* CBMAI 847 to produce considerable amounts of ligninolytic enzymes in 2–23% (w/v) of salt concentration is a feature that should be explored. According to D'Souza et al. (2006) the production of MnP and LiP by the unidentified basidiomycete fungus from mangrove swamps was inhibited by sea water medium at all the salt concentrations tested in the study (10–34 ppt) and only laccase was detected. Therefore, *M. racemosus* CBMAI 847 appears to be a good candidate for biotechnological application in highly saline conditions. Additionally, in a previous study of this same research group (da Silva et al., 2008) concerning RBBR decolorization by marine-derived fungi, using malt extract 2% (w/v) plus 3% (w/v) NaCl (the same culture conditions that were used in this study), the fungus *M. racemosus* CBMAI 847 increased RBBR decolorization from the 8<sup>th</sup> day (12%) to the 12<sup>th</sup> day (42%). It is worth to mention that this period coincides with the highest amounts of MnP production obtained in the present work (kinetic study, Fig. 3). Additionally, after 7 days of *M. racemosus* CBMAI 847 incubation in malt extract 2% (w/v) plus 3% (w/v) NaCl, 75376.34 UL<sup>-1</sup> of LiP and 2600.90 UL<sup>-1</sup> of MnP were detected (Table 2). The present results suggest that ligninolytic enzymes produced by *M. racemosus* CBMAI 847 could be acting in the RBBR decolorization.

## 5. CONCLUSION

Taking into account that marine-derived fungi can be an important resource for use in biotechnological processes due to their salt tolerance, the results from this study stimulate further investigations concerning the ligninolytic and other enzyme production by *A. sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857 and *M. racemosus* CBMAI 847. Since ligninolytic enzymes are involved in dye and other pollutant compound degradation, *M. racemosus* CBMAI 847 can be considered as a great target for future studies related to colored industrial effluent treatment and bioremediation in high salt concentration environments.

### **Acknowledgments**

The present work was supported by a grant from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 05/51213- 8). R.C. Bonugli-Santos was supported by a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) fellowship.

### **REFERENCES**

- Ahammed S, Prema P. Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. *Appl Biochem Biotechnol* 2002; 102–3.
- Arora DS, Gill PK. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microb Technol* 2001;28: 602–5;
- Arun A, Praveen RA, Arthi A, Ananthi M, Sathish KK, Eyini M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, pseudomonas isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Appl Biochem Biotechnol* 2008; 151: 132–42.
- Bugni TS, Ireland CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep* 2004; 21: 143–63.
- Buswell JK, Cai YJ, Chang ST. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMSMicrobiol Lett* 1995; 128: 81–8.
- Cullen D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J Biotechnol* 1997; 53: 273–89.
- D'Souza DT, Tiwari R, Sah Ak, Raghukumara C. Enhanced production of lacase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 2006; 38: 504–11.

- Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *App Catal B-Environ* 2000; 28: 83–99.
- Eibes G, Cajthaml GT, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 2005; 64: 408–14.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Khardziani T, Agathos SN. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World J Microb Biot* 2009; 25: 331–9.
- Gianfreda L, Rao MA. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Technol* 2004; 35: 339–54.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat J* 1999; 3: 1–25.
- Kamei I, Daikoku C, Tsutsumi Y, Kondo R. Saline-dependent regulation of manganese peroxidase genes in the hypersaline-tolerant white rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 2709–16.
- Kimura M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16: 111–20.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 1984; 169: 247–50.
- Levin L, Forchiassin F, Viale A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochem* 2005;40:1381–7.

- Levin L, Herrmann C, Papinutti VL. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochem Eng J* 2008; 39: 207–14.
- Lopez MJ, Vargas-García MC, Suárez-Estrella F, Nichols NN, Dien BS, Moreno J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40: 794–800.
- Macedo JA, Sette LD, Sato HH. Optimization studies for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp. *Food Sci Biotechnol* 2008; 17: 904–11.
- Martinez T, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 2005; 8: 195–204.
- Niladevi KN, Prema P. Effect of inducers and process parameters on lacase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolorization. *Bioresour Technol* 2008; 99: 4583–9.
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz G, Zvauya R, Read JS, Steiner W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresour Technol* 2002; 84: 259–63.
- Nyanhongo S, Levin L, Forchiassin F, Viale A. Optimization of a culture media for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30: 682–90.
- Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30: 157–60.

- Papinutti VL, Forchiassin F. Optimization of manganese peroxidase and lacase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus* (Lév.) Cke. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30: 536–41.
- Raeder J, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1985; 1: 17–20.
- Raghukumar C, D'Souza TM, Thorn RG, Reddy CA. Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. *Appl Environ Microb* 1999; 65: 2103–11.
- Raghukumar C, D'Souza-Ticlo D, Verma AK. Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi. *Crit Rev Microbiol* 2008; 34: 189–206.
- Saleem M, Ali MS, Hussain S, Jabbar A, Ashraf M, Lee YS. Marine natural products of fungal origin. *Nat Prod Rep* 2007; 24: 1142–52.
- Sette LD, de Oliveira VM, Rodrigues MFA. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microb Aust* 2008; 29: 18–20.
- Sette LD, Oliveira VM, Manfio GP. Isolation and characterization of alachlordegrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 2005; 87: 81–9.
- da Silva M, Passarini MRZ, Bonugli RC, Sette LD. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environ Technol* 2008; 29:1331–9.
- Souza DF, Tychanowicz GK, De Souza CGM, Peralta RM. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *J Basic Microbiol* 2006; 46: 126–34.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596–9.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22: 4673–80.
- Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2280–2284.

### CAPÍTULO 3. DIVERSITY OF LACCASE GENES AND EXTRACELLULAR ACTIVITY IN MARINE-DERIVED BASIDIOMYCETES

Rafaella C. Bonugli-Santos<sup>1,2</sup>; Lucia Regina Durrant<sup>1</sup>; Lara Durães Sette<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food Science Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP)  
P.O. Box 6121, CEP 13083-862, SP, Brazil

<sup>2</sup> National Institute for Health Quality Control, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Av. Brasil,  
4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Este capítulo é baseado no artigo original em revisão pela revista *Mycological Research* (submetido em 26 de Janeiro de 2010)**

#### ABSTRACT

Studies on laccases from marine-derived fungi are still limited. In the present work laccase activities and the diversity of laccase genes from three marine-derived basidiomycetes were evaluated. High amounts of laccase were produced by the fungi identified as *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (881.94 UL<sup>-1</sup>) and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (868.06 UL<sup>-1</sup>) when grown for 21 days at 28°C in the medium MA2ASW, prepared with artificial seawater. The three marine-derived basidiomycetes produced multiple distinct laccase sequences around 200 bp, which showed 53-89% similarity with the terrestrial basidiomycetes laccases. The isolates *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 showed the highest diversity of laccase genes, presenting four highly distinct laccase sequences. It is important to mention that this is the first report relating diversity of laccase genes from marine-derived fungi and our results revealed putative new laccases produced by the three basidiomycetes evaluated in the present work.

**Keywords:** Laccase, gene diversity, marine-derived fungi, basidiomycetes

## 1. INTRODUCTION

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) are one of the most important lignin-degrading enzymes with great potential in industrial applications including the chemical, fuel, food, agricultural, paper, textile and cosmetic industrial sectors (Sette et al., 2008). Laccases are multicopper oxidases that catalyze the oxidation of a variety of aromatic hydrogen donors with the concomitant reduction of oxygen to water. These enzymes are, generally, monomeric or more rarely, homo- and hetero-dimeric or homo-tetrameric glycoproteins, having their activity dependent on four copper ions, distributed among three different highly conserved binding sites (Thurston, 1994; Hoegger et al., 2006). This class of enzymes had their role expanded when it was found that they also have the ability to degrade non-phenolic components in the presence of mediator compounds, such as 2,2' azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) and 1-hydrobenzotriazole (HBT) (Bourbonnais et al., 1990, 1995), or fungal metabolites naturally present in soils, such as 3-hydroxyanthranilic acid (3HAA) (Eggert et al., 1996). These enzymes exhibit broad substrate specificity and it is able to oxidize a range of xenobiotic compounds including phenolic and industrial colored wastewaters (Baldrian, 2006).

Although many studies on laccase activity are being conducted, its biological role in fungi is still unclear. There are reports showing their involvement in cellular growth, control of pathogenicity and control of spores pigmentation (Leonowicz et al., 2001), sporulation (Thurston, 1994), as well as degradation of lignin (Eggert et al., 1996), among other functions.

Fungal laccases have been reported in different groups, mainly in the representatives of the phylum Basidiomycota, which are known as white-rot-fungi. This group comprises mostly basidiomycete fungi able to aerobically degrade and mineralize lignin (Thurston, 1994). However, there is a little information about laccase production by marine-derived fungi (Pointing et al., 1998; Raghukumar et al., 1999; Raghukumar et al., 2008). Fungi from marine



environments are able to produce new and biologically active secondary metabolites different from those produced by their terrestrial counterparts, since they are adapted to the salinity found in these environments (Bugni and Ireland, 2004; Saleem et al., 2007). Nevertheless, only recently this group of microorganisms has attracted attention as a potential source of new enzymes and biodegradation processes (Raghukumar et al., 1999; D'Souza et al., 2006; da Silva et al., 2008; D'Souza et al., 2009; Bonugli-Santos et al., 2010). In this context, the study of extracellular enzymes produced by marine-derived microorganisms is very important in applied biotechnology.

Different factors may influence the activity of laccase, such as pH, time of incubation, temperature, aeration, agitation, addition of inductor and carbon/nitrogen rate. Dong et al. (2005), showed that the composition of the culture medium and the method of incubation have direct influence on gene expression, resulting in different types of laccase gene isoforms. Recently, the development of molecular methods has opened new perspectives for investigations of functions of fungal laccase and laccase gene isoforms whereas a multiple gene family encodes the distinct laccase gene isoforms and many higher basidiomycetes have several laccase genes in their genome (Kellner et al., 2007). Analyses of laccase gene diversity have mostly been performed on Basidiomycota and xylariaceous Ascomycota from soil (Luis et al., 2004, 2005; Pointing et al., 2005; Kellner et al., 2007). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the production of laccase in different media and investigate the diversity of laccases genes from three basidiomycetes isolated from Brazilian sponges *Amphimedon viridis* and *Dragmacidon reticulata*.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Marine-derived basidiomycetes**

The basidiomycetes fungi used in this work were isolated from the Brazilian sponge *Amphimedon viridis* and *Dragmacidon reticulate* (Table 1), collected according Menezes et al. (2009) in the town of São Sebastião, northern coast of the state of São Paulo, Brazil, and were deposited in the Brazilian Collection of Microorganisms from Environment and Industry – CBMAI (Table 1).

### **2.2. Molecular characterization of marine-derived basidiomycetes and phylogenetic analyses**

Genomic DNA was extracted from cultures as described by da Silva et al., (2008). The ITS1-5.8S-ITS2 regions were amplified with the primers ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). PCRs were performed in a final reaction mixtures (25 uL) containing 5–25 ng genomic DNA, 0.4 uM of each primer, 0.2 uM dNTPs (GE Healthcare), 1.5 uM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2.0U Taq polymerase (Invitrogen) and 10X reaction buffer (Invitrogen). Amplification reactions were performed with the following cycling conditions: initial denaturation for 5min at 94°C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 1min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C and cooling to 4°C. Amplified products were purified, quantified and subjected to sequencing according to Sette et al. (2005) by using the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for an automated MegaBace sequencer (GE Healthcare). The sets of primers used for sequencing were ITS1 and ITS4.

Sequences were compared with ITS-rDNA sequence data from strains available at the public databases GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and CBS Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl/fungi/BioLoMICSSequences.aspx>) using BLAST N sequence match routines. The sequences were aligned using the CLUSTAL X program (Thompson et al., 1997)

and phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007). The Kimura two-parameter model (Kimura, 1980) was used to estimate evolutionary distance. The phylogenetic reconstruction was carried out using the neighbor-joining (NJ) algorithm, with bootstrap values calculated from 1000 pseudo-replicates runs, using the software routines included in the MEGA software. The nucleotide sequences of the marine-derived fungi determined in this study have been deposited at GenBank under the accession numbers shown in Table 1.

### **2.3 Growth conditions and induction of laccase**

Three fungal culture plugs (0.5 cm diameter) taken from the edge of the colony were transferred to 200 ml Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the following media: 2% malt extract broth (MA2), 2% malt extract broth plus 3% NaCl (MA2+3%NaCl), 2% malt extract broth prepared with artificial seawater (MA2ASW) (ASW: KBr 0.1 g l<sup>-1</sup>, NaCl 23.48 g l<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 10.61 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1.47 g l<sup>-1</sup>, KCl 0.66 g l<sup>-1</sup>, SrCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 0.04 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.92 g l<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 0.19 g l<sup>-1</sup> and H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.03 g l<sup>-1</sup>), and B&K broth (glucose 10 g l<sup>-1</sup>, peptone 2 g l<sup>-1</sup> and yeast extract 1 g l<sup>-1</sup>, D'Souza et al. 2006). The flasks were incubated for 7, 14 and 21 days at 140 rpm and 28°C.

In order to enhance laccase production, various inductors were added to the liquid media MA2 and B&K. The cultures were incubated under the same conditions described above. After 72 h incubation the following inductors were added to the cultures: 1 mM guaiacol, 1 mM CuSO<sub>4</sub> plus 0.3 mM o-dianisidine dihydrochloride or 2 g wheat bran. Laccase activity was evaluated after 7 days of incubation. All the experiments were run in duplicate. Cultures were harvested by centrifugation at 12,074g for 30 min (Eppendorf Centrifuge 5804R) and the supernatant used as enzyme source.

## **2.4 Laccase assay**

Laccase activity was measured using 2,2-azino-bis-ethylbenzothiazoline (ABTS) according to Buswell et al. (1995). The mixture was composed by 0.1 mL sodium acetate buffer 0.1 M (pH 5.0), 0.8 mL ABTS solution 0.03% (w/v), and 0.1 mL enzyme solution. ABTS oxidation was measured by monitoring the increase of absorbance at 420 nm. One enzyme unit was defined as 1.0  $\mu\text{mol}$  product formed per minute, per liter under assay conditions.

## **2.5 Laccase genes from marine-derived basidiomycetes**

### **2.5.1 PCR amplification**

The degenerate primer pair Cu1AF (5'-ACM WCB GTY CAY TGG CAY GG-3') and Cu2R (5'-G RCT GTG GTA CCA GAA NGT NCC-3') (20 mM; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) was used to amplify the laccase gene fragments among the copper binding regions cbr I and cbr II (D'Souza et al. 1996). For the amplifications, 5  $\mu\text{l}$  of the DNA extracts according to the item 2.2. were added to a 25  $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 2.5  $\mu\text{l}$  of 10 X reaction buffer (Invitrogen), 1.5  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (50mM) (Invitrogen), 0.4  $\mu\text{l}$  of dNTPs (25 mM each) (GE Healthcare), 1  $\mu\text{l}$  of each primer (20 mM) (Invitrogen), and 0.4  $\mu\text{l}$  of Taq DNA polymerase (Invitrogen). Dna amplifications were run on Eppendorf thermal cycler with an initial cycle of denaturation of 3 min at 94 °C followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, 2 min at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C. A control reaction without template was run to rule out the presence of contaminant DNA. Amplification of laccase sequences from DNA of *Trametes versicolor* (CBMAI 871) was also carried out on samples as a positive control to detect PCR failures. Amplified products were loaded and visualized on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. The bands of expected size according to the literature were cut and purified using *Kit GFX<sup>tm</sup> PCR DNA* and *GEL Band Purification* (GE Healthcare).

### 2.5.2 DNA sequencing and sequence analysis

PCR products were directly cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) according to the manufacturer's instructions, and transformed into *E. coli* JM109 competent cells. Due to the existence of different laccase gene types in a single taxon, up to 9 clones per cloning reaction were sequenced in both directions with M13 forward (5'CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC 3') and M13 reverse (5' TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC 3'). Amplified products were purified using GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) for subsequent sequencing using DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for an automated MegaBace DNA Analysis System 1000 (GE Healthcare), in accordance with the manufacturer's instructions.

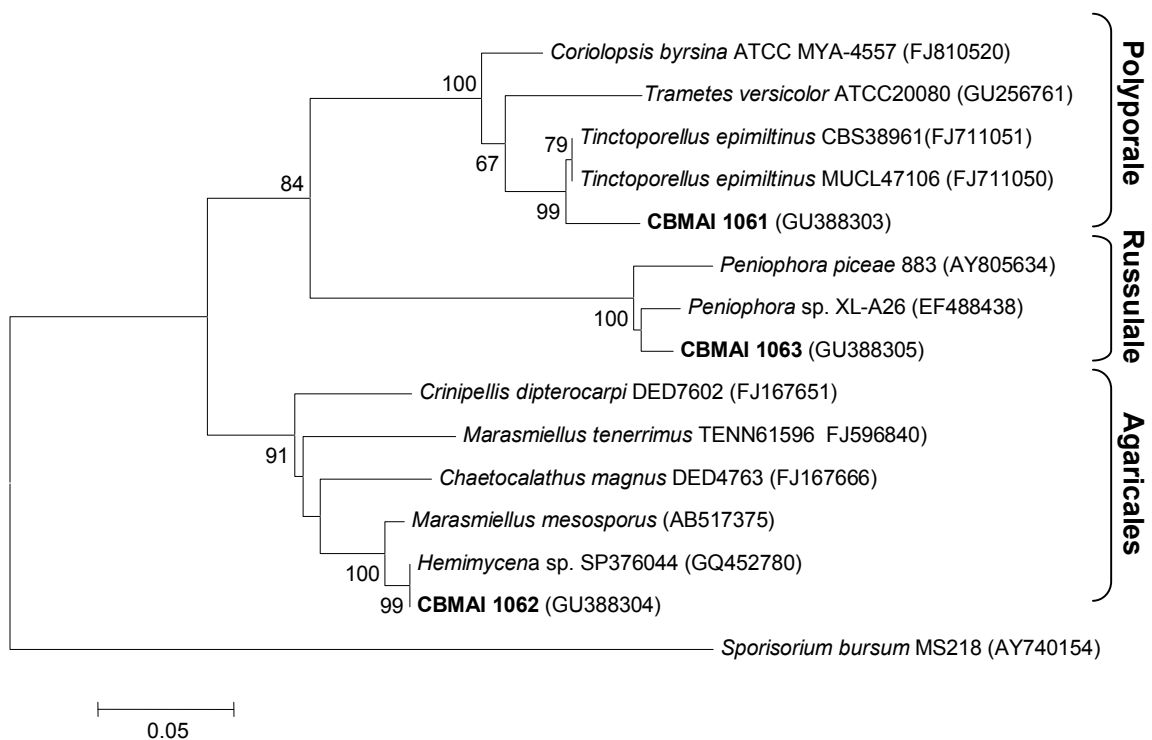
The sequences obtained were assembled in a contig using the phred/Phrap/Consed software and sequences matches done using the GenBank DNA database and the Gapped BlastN (NCBI) search algorithm (Altschul et al., 1997). The sequences were aligned using CLUSTAL X program (Thompson et al., 1997). To determine the intron positions within the amplified laccase genes, the obtained sequences were aligned with known laccase cDNA (e.g. *Neurospora crassa* [AAA33591](#) or *Trametes versicolor* [U44431](#)). The final alignment, corresponding to the complete DNA sequences, was manually corrected with BIOEDIT 7 (Hall, 1999) and Clustal W (Thompson et al., 1997). The non-coding sequences (intron) were discarded and the deduced proteins were determined before use of this alignment in phylogenetic programs. A distance approach using the Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) as implemented in MEGA software version 4.0 (Tamura et al., 2007) was used as substitution model. Laccase sequences of the marine-derived basidiomycetes were deposited in GenBank under the accession numbers given in Table 2.

### 3. RESULTS

The marine-derived basidiomycetes used in the present work were characterized taxonomically by molecular methods. Data derived from ITS-rDNA BLASTn (Table 1) and phylogenetic analyses (Figure 1) identified the isolate CBMAI 1062 as *Marasmiellus* sp., the isolate CBMAI 1061 as *Tinctoporellus* sp., and the isolate CBMAI 1063 as *Peniophora* sp. Additional analyses of the D1/D2 region from the 28S rDNA were carried out and corroborate the results from ITSr-DNA analyses.

**Table 1.** Marine-derived basidiomycetes identification and data from sampling, isolation and accession numbers

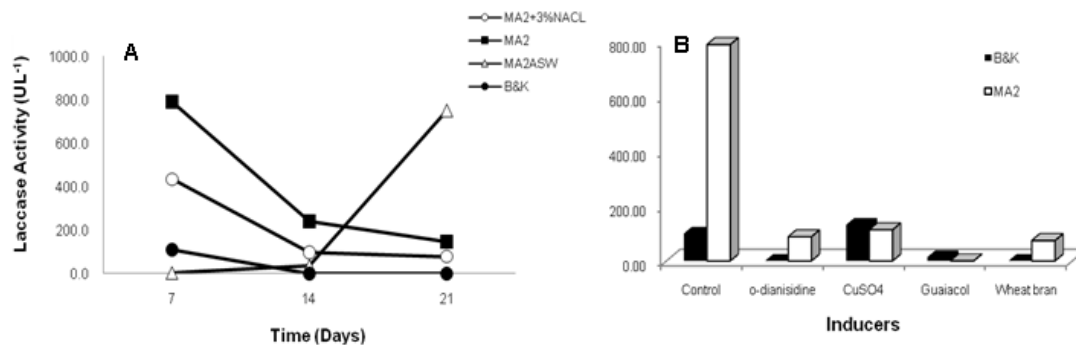
CBMAI accession number	Genbank accession number	Coral Source	Closest related species and % similarity		Molecular identification
			ITS	D1/D2	
1061	GU388303	<i>Dragmacidon reticulata</i>	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i> CBS38961 - 99%	<i>Perenniporia ochroleuca</i> CBS38736 - 96.5%	<i>Tinctoporellus</i> sp.
1062	GU388304	<i>Amphimedon viridis</i>	<i>Hemimycena</i> sp. SP376044 - 100%	<i>Marasmiellus</i> sp. DMC027 - 99.3%	<i>Marasmiellus</i> sp.
1063	GU388305	<i>Amphimedon viridis</i>	<i>Peniophora</i> sp. XLA26 - 97%	<i>Peniophora incarnata</i> NH10271 - 96.98%	<i>Peniophora</i> sp.



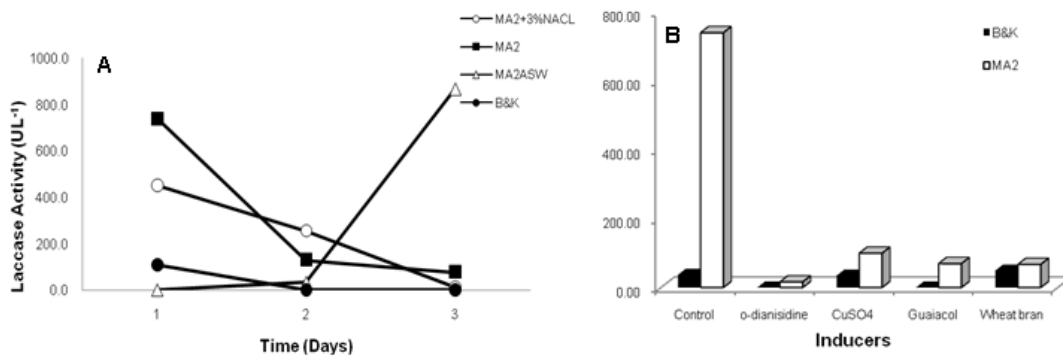
**Fig 1.** Phylogenetic tree based on ITS analyses (600 bp) showing closest relatives of marine-derived fungal isolates (Kimura two-parameter model; Neighbor-Joining algorithm and 1,000 pseudo-replicates bootstrap).

### 3.1 Laccase activity

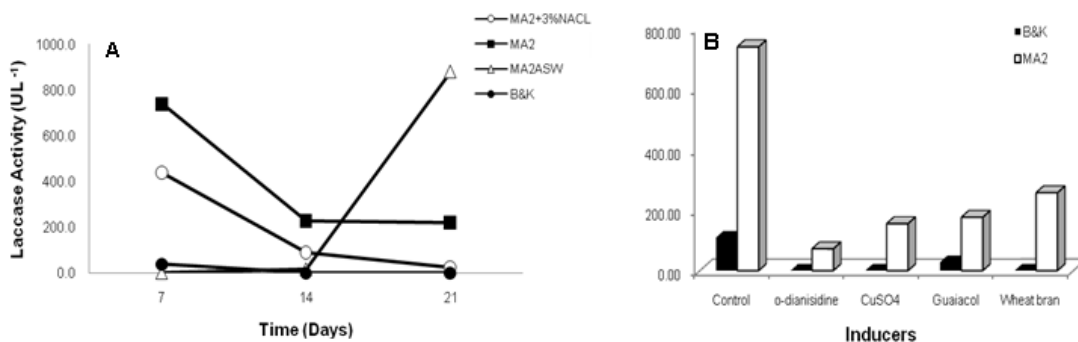
Regarding the experiments related to laccase production, the three fungi presented satisfactory enzyme activity values in all media used here (Figures 2, 3 and 4). For *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063, the highest production were obtained after 21 days of incubation in medium MA2ASW (881.94  $UL^{-1}$  and 868.06  $UL^{-1}$ , respectively). However, the fungus *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 presented highest laccase production after 7 days of incubation in medium MA2 (792.0  $UL^{-1}$ ). The medium B&K was the less efficient for enzyme production when compared to the other media used *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 (11.1  $UL^{-1}$ ), *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (108.79  $UL^{-1}$ ) and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (37.03  $UL^{-1}$ ).



**Fig 2.** Laccase activity of *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061: **A)** 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2 plus 3%NaCl, MA2ASW and B&K; **B)** inducers addition in media MA2 and B&K after 7 days of incubation.



**Fig 3.** Laccase activity of *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 : **A)** 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2 plus 3%NaCl, MA2ASW and B&K; **B)** inducers addition in media MA2 and B&K after 7 days of incubation.



**Fig 4.** Laccase activity of *Peniophora* sp. CBMAI 1063: **A)** 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2 plus 3%NaCl, MA2ASW and B&K; **B)** inducers addition in media MA2 and B&K after 7 days of incubation.



The media MA2 and B&K where the highest and the lowest enzymatic activities were produced after 7 days of fungal incubation, were selected for additional experiments using inductors. Only a little increase on laccase activities were obtained with *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 when CuSO<sub>4</sub> was used (Figure 2), and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (Figure 3) when wheat bran was added to the B&K medium.

### 3.2 Laccase gene diversity

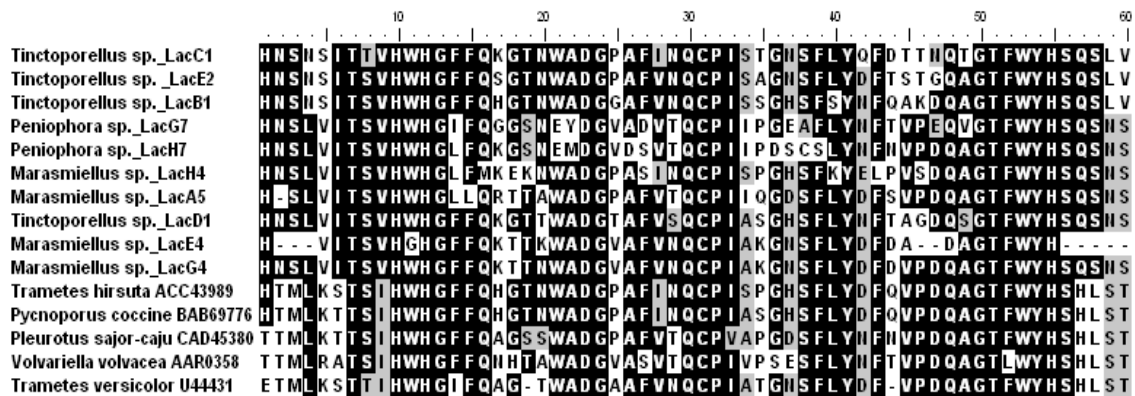
Since the three marine-derived basidiomycetes produced high amounts of laccase, the detection and diversity of laccase genes were investigated. For all basidiomycetes strains tested single-PCR product were obtained with the primer pair Cu1AF/Cu2R, showing DNA fragments with the expected-size: *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 (200 bp), *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (150 bp) and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (210 bp).

The amplified products were cloned before sequencing, since fungi can contain several laccase alleles and multiple distinct laccase genes. Nine clones per PCR product were sequenced, once different banding patterns were obtained. The sequencing revealed the presence of different laccase genes. Out of 27 clones sequenced, nine were identified as putative laccase genes based on the closest match in GenBank (Table 2), and they were selected for the neighbor-joining analysis: *Tinctoporellus* sp.\_LacB1, *Tinctoporellus* sp.\_LacC1, *Tinctoporellus* sp.\_LacD1, *Tinctoporellus* sp.\_LacE2, *Marasmiellus* sp.\_LacA5, *Marasmiellus* sp.\_LacE4, *Marasmiellus* sp.\_LacG4, *Marasmiellus* sp.\_LacH4 and *Peniophora* sp.\_LacH7 and *Peniophora* sp.\_LacG7 clones (Table 2). The others 17 clones were not identified as laccase genes (fragments > 300 bp) based on the GenBank database.

**Table 2.** Strain, results of PCR amplifications and intron information of laccase genes from marine-derived basidiomycetes

Strain	Clones	Closest identified relative and % similarity	Intron start position (bp)	Size intron (bp)	GenBank accession number
<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	Lac_B1	81% <i>Trametes</i> sp. (ABB21020)	0	0	GU444037
	Lac_C1	62% <i>Lentinus tigrinus</i> (AM419159)	153-204	51	GU444038
	Lac_D1	53% <i>Trametes versicolor</i> (BAD98307)	147-210	63	GU444039
	Lac_E2	88% <i>Polyporus ciliatus</i> (AAG09231)	0	0	GU444040
<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	Lac_A5	89% <i>Panus</i> sp. (AAP78656)	0	0	GU444031
	Lac_E4	82% <i>Trametes versicolor</i> (BAD98307)	0	0	GU444032
	Lac_G4	79% <i>Polyporus brumalis</i> (ABN13591)	0	0	GU444033
	Lac_H4	71% <i>Pleurotus</i> sp. (CAA06291)	0	0	GU444034
<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	Lac_H7	64% <i>Pleurotus</i> sp. (CAA06291)	0	0	GU444036
	Lac_G7	61% <i>Pleurotus sajor-caju</i> (CAD45380)	142-189	56	GU444035

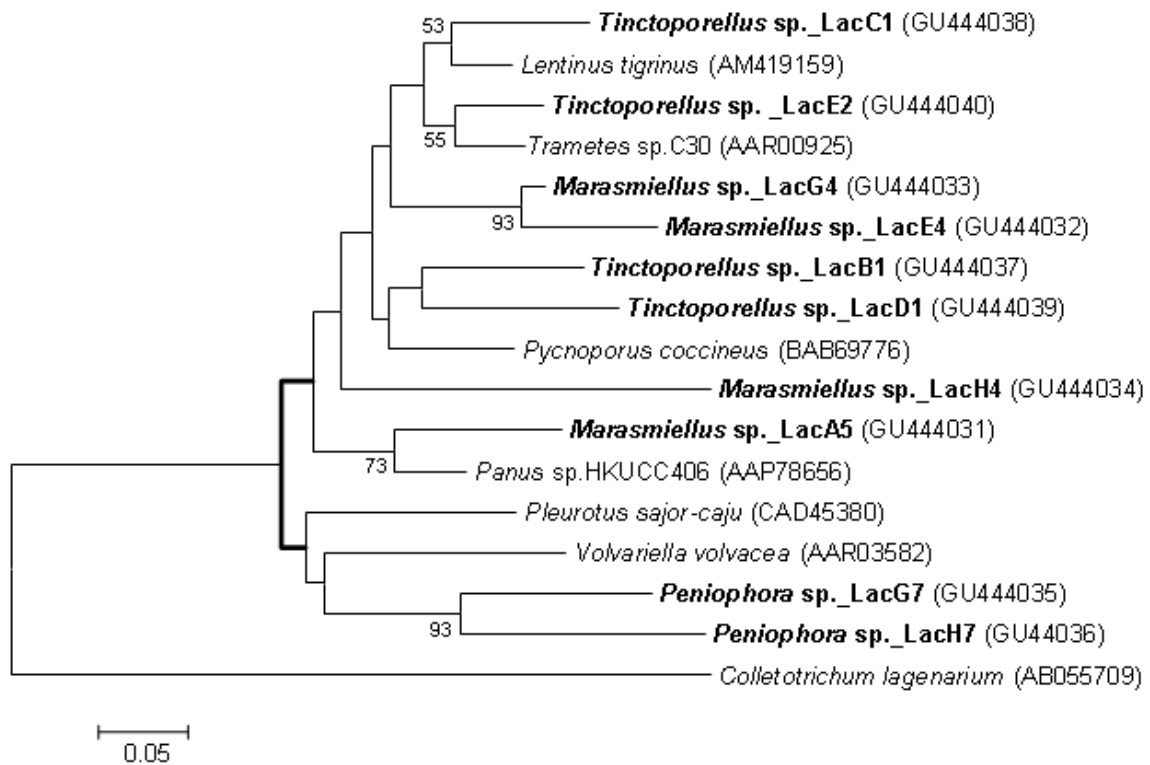
The new nucleotide sequences obtained were aligned with known laccase genes and protein-coding regions (cDNA) retrieved from GenBank, and the alignment was used to identify the position of introns and exons (Table 2). Introns appeared to be localized between positions: (1) 153-204 for *Tinctoporellus* sp.\_LacC1, (2) 147-210 for *Tinctoporellus* sp.\_LacD1, and (3) 142-189 for *Peniophora* sp.\_LacG7. This non-coding sequences (intron) were discarded and the deduced proteins were determined (Figure 5). In contrast, no intron was detected in the amplified laccase sequences from *Tinctoporellus* sp.\_LacB1, *Tinctoporellus* sp.\_LacE2, *Peniophora* sp.\_LacH7, and in all laccase sequences from *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062.



**Fig 5.** Alignment of the deduced amino acid sequences between cbr I and cbr II arranged according to the different marine-derived basidiomycetes laccase sequence. The sequences are compared with the corresponding sequences from *Trametes hirsuta* (ACC43989), *Pycnoporus coccine* (BAB69776), *Pleurotus sajor-caju* (CAD45380), *Volvariella volvacea* (AAR0358) and *Trametes versicolor* (U44431). Amino acids with a  $\geq 50\%$  match are highlighted.

Laccase sequences (Table 2 and Figure 6) from strain *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 displayed 81% similarity with regions of the previously described laccase genes of *Trametes* sp. (**ABB21020**) from *Tinctoporellus* sp.\_LacB1, 62% similarity with *Lentinus tigrinus* (**AM419159**) and 60% *Trametes* sp. (**ABB21020**) from *Tinctoporellus* sp.\_LacC1, 53% similarity with regions of the previously described laccase genes for *Trametes versicolor* (**BAD98307**) from clone *Tinctoporellus* sp.\_LacD1 and 82% similarity with *Polyporus ciliatus* (**AAG09231**) and *Trametes* sp. (**AAR00925**) from *Tinctoporellus* sp.\_LacE2. Laccase sequence from *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 showed 89% similarity with regions of the previously described laccase gene of *Panus* sp. (**AAP78656**) from *Marasmiellus* sp.\_LacA5, 82% similarity of *Trametes versicolor* (**BAD98307**) from *Marasmiellus* sp.\_LacE4, 79% similarity of *Polyporus brumalis* (**ABN13591**) from *Marasmiellus* sp.\_LacG4, and 70% similarity with *Trametes hirsute* (**ACC43989**) from *Marasmiellus* sp.\_LacH4. On the other hand, *Peniophora* sp. CBMAI 1063 laccase sequence *Peniophora* sp.\_LacH7 displayed 64% similarity with regions of the previously described laccase

genes of *Pleurotus* sp. (**CAA06291**) and *Peniophora* sp.\_LacG7 61% similarity of *Pleurotus sajor-caju* (**CAD45380**).



**Fig 6.** Phylogenetic tree of marine-derived basidiomycetes laccase sequences. The tree was constructed based on an amino acid alignment. Bootstrapping was performed with 1000 pseudo-replications in Kimura 2-parameter analysis. Bootstrap values greater than 50% are indicated at branch nodes and the NJ tree was rooted using sequences of the ascomycetes *Colletotrichum lagenarium* (GenBank accession no. AB055709).

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Laccase activity

Marine invertebrates, especially sponges, represent an important source for potential active and biologically functional natural products (Osinga et al., 2001). As filter feeders, sponges are exposed to pollutants present in waters, and accumulated impurities from phytoplankton, or other suspended matters. Hence, it is reasonable to believe that some

microbes in sponges produce hydrolytic enzymes to convert these organic matters into nutrients (Menezes et al., 2009). Basidiomycete fungi are considered as the most efficient microorganisms to produce enzymes responsible for the breaking down of lignocellulosic material. The production of these enzymes by marine-derived fungi from Ascomycota, Zygomycota and Basidiomycota has been poorly investigated (Raghukumar, 2008; Bonugli-Santos et al., 2010).

In the present work three sponges-derived basidiomycetes showed capacity to produce high levels of laccase in different culture conditions. The highest laccase activity was obtained with *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 after 21 days of growth in medium MA2ASW. However, high amounts of laccase were also produced by the three basidiomycetes after 7 days of incubation in medium MA2 (without salt). The presence of laccase activity in media containing salt (MA2ASW and MA2+3%NaCl) could be very important for industrial and biotechnological processes in saline conditions (Raghukumar et al., 2008).

The industrial importance of laccases has led to the need to enhance laccase-producing ability of fungi (Lorenzo et al., 2002). As the production of laccase by fungi is highly regulated by nutrients (Arora and Gil, 2001), studies concerning the use of different nutrient sources and related to medium optimization could be considered a useful tool for improving production of laccase from fungi. Based on the literature, many factors can affect laccase synthesis, including concentration and type of carbon and nitrogen sources as well as metal ions (Galhaup et al., 2001; Levin et al., 2002; Baldrian et al., 2002).

Papinutti and Forchiassin (2003), Levin et al. (2008), and Bonugli-Santos et al. (2010) reported the increasing of laccase activity in medium with nitrogen sources. However, in the present study laccase activity in medium B&K was lower than those found in media containing malt extract as carbon sources. Arora and Gil (2001) reported that the good production of

laccase in medium MA2 could be attributed to the fact that malt extract is rich in aromatic amino acids tryptophan and tyrosine.

The increasing of laccase production has been extensively reported in literature as a response to the inductors addition (Galhaup et al., 2002; Levin et al., 2002; Papinutti et al., 2003; Souza et al., 2006). In this work, laccase production in the presence of inductors was only favored when the medium B&K was used. In the study performed by Cavallazzi et al., (2005) the addition of inductor had an expressive effect in cultures with low nitrogen concentration. On the other hand, in high carbon source concentrations the induction was not detected. In the present study, laccase activity was increased after the addition of CuSO<sub>4</sub>, wheat bran and guaiacol to *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063, respectively. Copper and phenolic compounds (wheat bran and guaiacol) have been reported to be strong laccase inductors in several species (Pointing et al., 2000; Galhaup et al., 2002; Souza et al., 2006; Elisashvili et al., 2008). Results from the present work and from previous studies, suggest that there is a wide variation on laccase induction depending on the fungi and culture conditions (Pointing et al., 2000; Souza et al., 2006; Leonowicz et al., 2001; Elisashvili et al., 2008).

#### **4.2 Laccase gene diversity**

The three marine basidiomycetes presented a relatively high diversity of laccase genes, which can possibly have distinct functions (Litvintseva and Henson, 2002). The heterogeneity among laccase genes in fungi has been previously documented (D'Souza et al., 1996; Mansur et al., 1997; Lyons et al., 2003).

The NJ analyses showed that the marine-derived basidiomycetes strains were grouped in two main clades closely related to the terrestrial fungal strains. *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 formed a cluster together with laccase genes from *Trametes*

sp., *Lentinus* sp., *Pycnoporellus* sp. and *Panus* sp. (Figure 6). On the other hand, *Peniophora* sp. CBMAI 1063 clustered with laccase genes from *Pleurotus* sp. and *Volvariella* sp. Within this initial clade the different laccase genes belonging to a single species were not grouped in a common clade (e.g. *Marasmiellus* sp. \_LacA5 Fig 6). According to Luis et al. (2004), these results indicate that these fungi possess genes belonging to different families of laccases, derived from different ancestral laccase genes. In a previous study by Valderrama et al. (2003), related to evolution and structural diversity of laccase genes, the topology of the phylogenetic trees indicate that a single monophyletic branch exists for fungal laccases and that laccase isozyme genes may have evolved independently, possibly through duplication-divergence events.

Laccase sequences derived from *Tinctoporellus* sp. (LacB1 and LacD1), *Marasmiellus* sp. (LacE4, LacG4 and LacH4) and *Peniophora* sp. (LacG7 and LacH7) did not grouped with described laccase genes, suggesting the presence of putative new laccase genes. However, the available knowledge on laccase diversity in fungal is still scarce to assign reliably sequences to taxa (Luis et al., 2004). Additional information on the laccase gene diversity in marine basidiomycetes and their ancestors is needed to elucidate the diversification of these genes during evolution. However, the presence of different laccase genes can be related to variation in enzymatic activity in the saline media and also in the response to different inducers.

## **5. CONCLUSION**

Since the marine-derived basidiomycetes presented expressive production of laccase in media containing salt, these fungi are expected to present a natural advantage, in comparison to their terrestrial counterparts, to be used in high salt concentration processes, such as the industrial wastewater treatment and bioremediation of areas contaminated with environmental pollutants.

The present study represents the first characterization of fungal laccase genes from marine environment, since to our knowledge there have been no previous reports on marine-derived laccase genes. Results from this work, open a perspective to future studies related to the detected genes to precise functions and the ecological role played by these basidiomycetes in marine ecosystems.

### **Acknowledgments**

The present work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 05/60175-2). R.C. Bonugli-Santos was supported by a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) fellowship.



## REFERENCES

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Scheffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25, 3389– 3402.
- Arora D.S., Gill P.K., 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Tech.* 28, 602–605.
- Baldrian, P., Gabriel, J., 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 69-74.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242.
- Bonugli-Santos, R.C., Durrant, L.R., da Silva, M., Sette, L.R., 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microb. Tech.* 46 (1), 32-37.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,20-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microb.* 61, 1876–1876.
- Bugni, T.S., Ireland, C.M., 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 21,143-163.
- Buswell, J.K., Cai, Y.J., Chang, S.T., 1995. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett.* 128, 81-88.
- Cavallazzi, J.R.P., Kasuya, C.M., Soares, M.A., 2005. Screening of inducers for laccase production by *lentinula edodes* in liquid medium. *Braz. J. Microbiol.* 36, 383-387.

- D'Souza, T.M., Boominathan, K., Reddy, C.A., 1996. Isolation of Laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microb.* 62, 3739–3744.
- D'Souza, D.T., Tiwari, R., Sah, A.k., Raghukumara, C., 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb. Tech.* 38, 504–511.
- D'Souza-Ticlo, D., Sharma, D., Raghukumara, C., 2009. A Thermostable Metal-Tolerant Laccase with Bioremediation Potential from a Marine-Derived Fungus. *Mar Biotechnol.* 11, 725–737.
- Dong, J.L., Zhang, Y.M., Zhang, R.H., Huang, W.Z., 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *J. Basic Microbiol.* 45(3), 190-198.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E., 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391, 144–148.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., Agathos, S.N., 2008. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World J Microb Biot.* 25, 331-339.
- Galhaup, C., Haltrich, D., 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *App.I Microbiol. Biot.* 56, 225–232.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D., 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycetes *Trametes pubescens*. *Enzyme*
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.

- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kues, U., 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* 273, 2308–2326.
- Kellner, H., Luis, P., Buscot, F., 2007. Diversity of laccase-like multi copper oxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61: 153–163.
- Kimura, M., 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewsha, A., Hofrichter, M., Wesernberg, D., Rogalski, J., 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbial.* 41(4), 185-227.
- Levin, L., Forchiassin, F., Ramos, A.M., 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94, 377–383.
- Levin, L., Herrmann, C., Papinutti, V.L., 2008. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Eng. J.* 39, 207–214.
- Litvintseva, A.P., Henson, J.M., 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccasae genes from *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, the take-all fungus. *Appl. Environ. Microbiol.* 68,1305–1311.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, R.S., Sanromán, A., 2002. Improvement in laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresour. Technol.* 82, 109–113.
- Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., Buscot, F., 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil. Biol. Biochem.* 36, 1025–1036.

- Luis, P., Kellner, H., Martin, F. Buscot, F. 2005. A molecular method to evaluate basidiomycete laccase gene expression in forest soils. *Geoderma*, 128, 18–27.
- Lyons, J.I., Newell, S.Y., Buchan, A., Moran, M.A., 2003. Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a Southeastern US salt marsh. *Microb. Ecol.* 45, 270–281.
- Mansur, M., Suarez, T., Fernandez-Larrea, J., Brizuela, M., Gonzalez, A., 1997 Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2637–2646.
- Menezes, C.B., Bonugli-Santos, R.C., Miqueletto, P.B., Passarini, M.R.Z., Silva, C.H.D., Justo, M.R., Leal, R.R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D., 2009. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res.* doi:10.1016/j.micres.2009.09.005.
- Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J.G., Hoffmann, F., Reitner, J., Schumann-Kindel G., 2001. Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*. 461:55–62.
- Papinutti, V.L., Diorio, L.A., Forchiassin, F., 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 157-160.
- Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P., Jones, E.B.G., 1998. A qualitative assessment of lignocellulose degrading activity in marine fungi, *Bot. Mar.* 41, 290–298.
- Pointing, S.B., Jones, E.B.G., Vrijmoed, L.L.P., 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*. 92,139–144.
- Pointing, S.B., Pelling, A.L., Smith, G.J.D., Hyde, K.D., Reddy, C.A., 2005. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycol. Res.* 109, 115–124.

- Raghukumar, C., D'Souza, T.M., Thorn, R.G., Reddy, C.A., 1999. Lignin-Modifying Enzymes of *Flavodon flavus*, a Basidiomycete Isolated from a Coastal Marine Environment. *Appl. Environ. Microb.* 65, 2103–2111.
- Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., Verma, A.K., 2008. Treatment of Colored Effluents with Lignin-Degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-Derived Fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 34,189–206.
- Saleem, M., Ali, M.S., Hussain, S., Jabbar, A., Ashraf, M., Lee, Y.S., 2007. Marine natural products of fungal origin. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1142–1152.
- da Silva, M., Passarini, M.R.Z., Bonugli, R.C., Sette, L.D., 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environ. Technol.* 29, 1331-1339.
- Sette, L.D., Oliveira, V.M., Manfio, G.P., 2005. Isolation and characterization of alachlordegrading actinomycetes from soil. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 87,81–9.
- Sette, L.D., Oliveira, V.M. de, Rodrigues, M.F.A., 2008 Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microbiol. Australia.* 29, 18-20.
- Souza, D.F., Tychanowicz, G.K., Souza. C.G.M., Peralta, R.M., 2006. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *J. Bas. Microbiol.* 46, 126–134.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar. S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin. F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids. Res.* 24:4876–82.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19–26.

Valderrama, B.; Oliver, P.; Medrano-Soto, A.; Vazquez-Duhalt, R., 2003. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 84: 289–299, 2003.

## CAPÍTULO 4. EFFICIENT DYE DECOLORIZATION AND LIGNINOLYTIC ACTIVITY BY MARINE-DERIVED BASIDIOMYCETES

Rafaella C. Bonugli-Santos<sup>1,2</sup>; Lucia Regina Durrant<sup>1</sup>; Lara Durães Sette<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Food Science Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP)  
P.O. Box 6121, CEP 13083-862, SP, Brazil

<sup>2</sup>Microbial Resource Division - CPQBA, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6171,  
CEP 13081-970 Paulinia, SP, Brazil

**Este capítulo é baseado no artigo “Efficient dye decolorization and ligninolytic activity by marine-derived basidiomycetes” em fase de finalização para submissão à revista Bioresource Technology**

### ABSTRACT

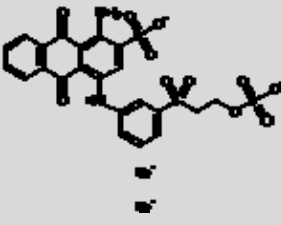
Remazol Brilliant Blue R (RBBR) is one of the most important dyes in the textile industry and represents an important class of toxic organopollutants. Fungi that produce ligninolytic enzymes are reported to be efficient in the degradation of recalcitrant pollutants and dye decolorization. The present study reports the production of ligninolytic enzymes under saline and non-saline conditions and the decolorization of RBBR dye by three marine-derived basidiomycetes (*Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063). Ligninolytic enzymes were highly produced by these fungi, mainly in the medium containing malt extract as carbon source (non-saline condition) and in the medium formulated with artificial seawater (saline condition). Wheat bran was the best inductor for LiP and MnP. RBBR was decolorized up to 100% by the three marine fungi, where *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 was the most efficient fungus due to its ability to completely decolorize the dye after 3 days of incubation. MnP was the main enzyme produced during RBBR decolorization. Our results suggest the potential of these three marine basidiomycetes fungi in the dye decolorization and colored (textile) effluents treatments, as well as in the degradation of others organopollutants in saline and non-saline conditions.

**Keywords:** Marine-derived fungi, basidiomycete, dye decolorization, ligninolytic enzymes

## 1. INTRODUCTION

Synthetic dyes are extensively used in textile, paper, pharmaceutical, cosmetics and food industries (Enayatzamir et al., 2009). The dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR), also known as Reactive Blue 19, is one of the most important dyes in the textile industry and represents an important class of toxic organopollutants (Palmieri et al., 2005). Since the RBBR is an anthracene derivative (table 1), it has been proposed as an efficient screening method for fungi that are able to degrade recalcitrant pollutants, including aromatic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and synthetic dyes (da Silva et al., 2008, Sette et al., 2008).

**Table 1.** Characteristics of the synthetic dye RBBR

Dye	Class	$\lambda_{\max}$ (nm)	CI name	Structure
Remazol Brilliant Blue R	Anthraquinonic	595	Reactive Blue 19	

The discharge of very small amounts of dyes impedes light penetration into water, retards photosynthesis, inhibits the growth of aquatic biota, interferes with gas solubility in water bodies and is esthetically displeasing (Banat et al., 1996; Raghukumar et al., 2008). In addition, colored effluents released by different industries, especially the textile industry, may be mutagenic, carcinogenic and toxic (Chung et al., 1992).

Synthetic dyes are usually treated by physical or chemical methods (Fu and Viraraghavan, 2001). However, these methods are time-consuming and generally have exorbitant costs. Currently, one of the possible alternatives for the treatment of dye is the use of ligninolytic fungi, that are able to produce an extracellular nonspecific and non-stereoselective enzyme system, such as lignin peroxidases (LiP, EC 1.11.1.14), manganese peroxidases (MnP,



EC 1.11.1.13) and laccases (EC 1.10.3.2) (Enayatnamir et al., 2009). The white-rot basidiomycetes are a well known group of ligninolytic fungi that have been used in bioremediation of various pollutants, including the synthetic dyes, since they are efficient producers of ligninolytic enzymes (Kaushik and Malik, 2009, Hamid and Khalil-ur-Rehman, 2009).

Decolorizing ability of ligninolytic white-rot fungi has been extensively studied in terrestrial basidiomycetes (Kaushik and Malik, 2009). According to Hernández-Luna et al. (2008) the recent isolation of strains with a better color removal ability than reference strains directs worldwide attention towards to the search of fungi belonging to different ecophysiological and taxonomic groups for biotechnological application in bioremediation.

Marine-derived fungi have been reported as producers of ligninolytic enzymes (Raghukumar et al., 1994, 2002; Pointing et al., 1998; D'Souza et al., 2006; D'Souza et al., 2009). However, they have not been explored sufficiently for dye decolorization and colored effluent treatments. Fungi from marine environments are adapted to high pressure and the presence of salt, thus ligninolytic enzymes produced by marine-derived fungi should be applied in bioremediation of lignin-based derivatives in colored industrial pollutants such as paper and pulp mills, tanneries, molasses-based distilleries, and textile mills. According to Raghukumar et al. (2008) these effluents are mostly alkaline and have high salt content.

The three marine-derived basidiomycetes studied in this paper were isolated from marine sponge, according to Menezes et al. (2009) and showed significant laccase activity under saline conditions (chapter 3). Therefore, the objective of the present study was to evaluate the MnP and LiP activities and the ability to decolorize RBBR dye by these fungi.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Marine-derived basidiomycetes**

Basidiomycetes fungi used in this work, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063, were isolated from the Brazilian sponge *Amphimedon viridis* and *Dragmacidon reticulata*, collected according to Menezes et al., (2009) in the town of São Sebastião, northern coast of the São Paulo state, Brazil, and were deposited at Brazilian Collection of Microorganisms from Environment and Industry – CBMAI.

### **2.2 Ligninolytic activity and induction of MnP and LiP**

To evaluate the activity of MnP and LiP, three fungal culture plugs (0.5 cm diameter) taken from the edge of the colony were transferred to 200 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the following media: 2% malt broth (MA2), 2% malt broth plus 3% NaCl (MA2+3%NaCl), 2% malt broth prepared with artificial seawater (MA2ASW), (ASW: KBr 100 mg L<sup>-1</sup>, NaCl 2,348 mg L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 1,061 mg L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 1,470 mg L<sup>-1</sup>, KCl 30 mg L<sup>-1</sup>), and B&K broth (glucose 10,000 mg L<sup>-1</sup>, peptone 2,000 mg L<sup>-1</sup> and yeast extract 1,000 mg L<sup>-1</sup>, D'Souza et al. 2006). The flasks were incubated for 7, 14 and 21 days at 140 rpm and 28°C.

In order to enhance MnP and LiP production, different inductors were added to the liquid media MA2 and B&K. The cultures were incubated under the same conditions described above and after 72 h of incubation the following inductors were added separately to the culture media: 1 mM guaiacol, 1 mM CuSO<sub>4</sub> plus 0.3 mM o-dianisidine dihydrochloride or 2000 mg L<sup>-1</sup> wheat bran. MnP and LiP activities were evaluated after 7 days of incubation. All the experiments were run in duplicates. Cultures were harvested by centrifugation at 12,074g for 30 min (Eppendorf Centrifuge 5804R) and the supernatant used as enzyme source.

### **2.2.1 Enzymes assays**

All enzymes activities were measured spectrophotometrically (Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japan). MnP activity was measured by phenol red oxidation method at 610 nm (Kuwahara et al., 1984). The reaction mixture was composed by 500  $\mu$ L enzymatic extract, 100  $\mu$ L phenol red (0.01%, w/v), 100  $\mu$ L sodium lactate (0.25 M), 200  $\mu$ L albumin bovine (0.5%, w/v), 50  $\mu$ L MnSO<sub>4</sub> (2 mM), 50  $\mu$ L hydrogen peroxide in sodium succinate buffer (20mM, pH 4.5). The mixture was incubated at 30 °C for 5min and the reaction was interrupted by the addition of 40  $\mu$ L NaOH (2N).

LiP activity was determined by the oxidation of veratryl alcohol as described by Arora and Gill (2001). The mixture reaction was composed by 500  $\mu$ L enzyme extract, 1mL sodium tartarate buffer 125 mM pH 3.0, 500  $\mu$ L veratryl alcohol 10 mM; and 500  $\mu$ L hydrogen peroxide 2 mM. The reaction was started by adding hydrogen peroxide and the appearance of veratraldehyde was determined at 310 nm.

Laccase activity was determined using 2,2-azino-bis(ethylbenzothiazolines) (ABTS) according to Buswell et al. (1995). The mixture was composed by 0.1 mL sodium acetate buffer 0.1M (pH 5.0), 0.8 mL ABTS solution 0.03% (w/v) and 0.1 mL enzyme solution. The ABTS oxidation was measured by monitoring the increase in absorbance at 420 nm.

One enzyme unit was defined as 1.0  $\mu$ mol product formed per minute under the assay conditions.

### **2.3 Decolorization on solid media supplemented with RBBR**

To evaluate the decolorization ability on solid media, the three fungi were inoculated on Petri dishes containing the media MA2, MA2+3%NaCl, MA2ASW and incubated for 7 days at 28°C. From these plates, one culture plug (0.5 cm diameter) from the edge of the colony was transferred to other Petri dishes with the same culture media enriched with increasing

concentrations of RBBR dye (200, 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup>), and incubated for 21 days at 28°C. The fungal growth and the decolorization ability on these plates were compared with the controls (RBBR-free inoculated media) after 7, 14 and 21 days of incubation. All assays were conducted in triplicate and in the dark (da Silva et al., 2008).

#### **2.4 Determination of decolorization ability on liquid medium supplemented with RBBR**

The fungi were inoculated on Petri dishes with MA2 plus 3% NaCl and incubated for seven days at 28°C. From these plates, two fungal culture plugs (0.5 cm diameter) from the edge of the colony were transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 ml MA2 broth. After 72 h incubation at 140 rpm and 28°C, RBBR was added to MA2 broth as an aqueous solution to a final concentration of 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>. The flasks were incubated for an additional 7 days under the same conditions. Control experiments were conducted incubating cell-free medium with RBBR and RBBR-free inoculated medium. All assays were conducted in duplicate and in the dark. Aliquots of 1 ml from the cultures were taken right after dye addition (zero time) and every 24 hours after dye addition for 7 days. Samples were centrifuged (12,074 g, 10 min) and the supernatants were diluted ten-fold with distilled water prior the UV/VIS spectrophotometry analysis (Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japan). The absorption spectra were read at the range of 200–800 nm. The uninoculated flask containing the dye was used as reference to correct the abiotic colour disappearance, and the inoculated medium without dye was used as blank, since some of the fungi produced natural pigments in the medium. Color reduction was followed spectrophotometrically and decolorizing activity was calculated from the decrease in absorption of the peak maximum for RBBR dye. The decolorization efficiency was expressed as follows (López et al., 2006; da Silva et al., 2008):

$$\text{Decolorization (\%)} = \frac{A_{\lambda \text{ initial}} - A_{\lambda \text{ Final}}}{A_{\lambda \text{ initial}}} \times 100$$

where  $A_{\lambda, \text{ initial}}$  = initial absorbance and  $A_{\lambda \text{ final}}$  = final absorbance.

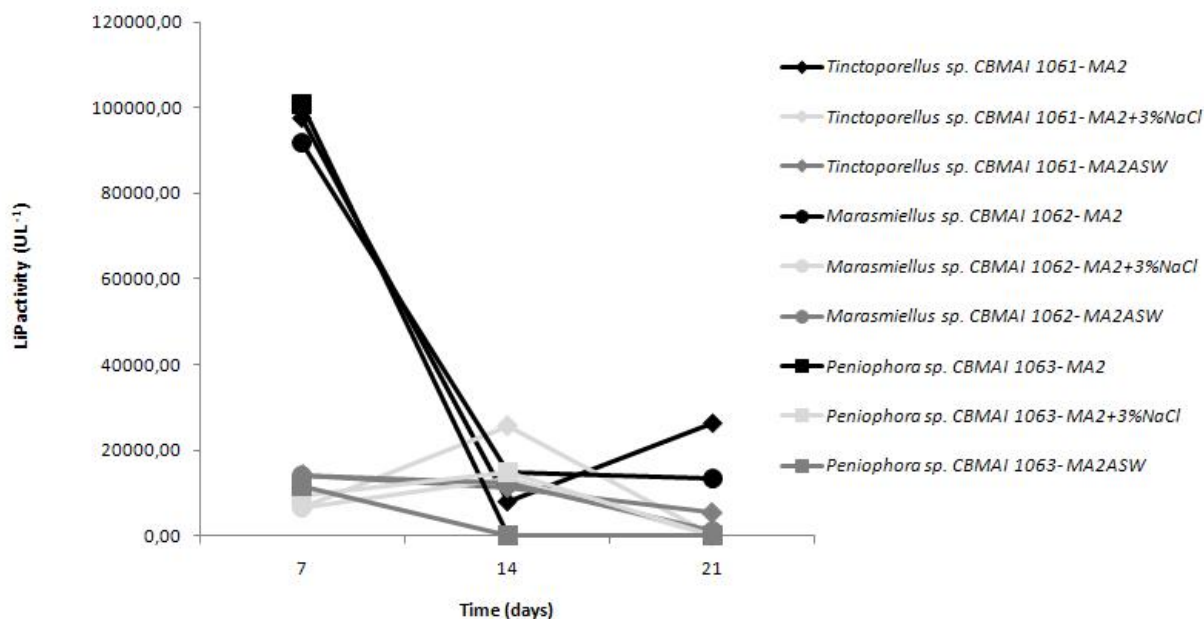
To discard mycelium participation in dye decolorization (enzymatic decolorization), RBBR (500 ppm) were added to 1 ml clear supernatants samples obtained from 7-day-old cultures (RBBR-free). Additionally, ligninolytic activities were evaluated, being the absorption spectra measured (in every 2 h from time zero during 24 h of incubation at 28 °C).

## RESULTS

### 3.1 Ligninolytic activity and induction of MnP and LiP

The activity of laccase by the marine-derived basidiomycetes was showed in a previous study (Chapter 3). In the present study, LiP and MnP activities were evaluated in four different media after 21 days of incubation (Anexo I).

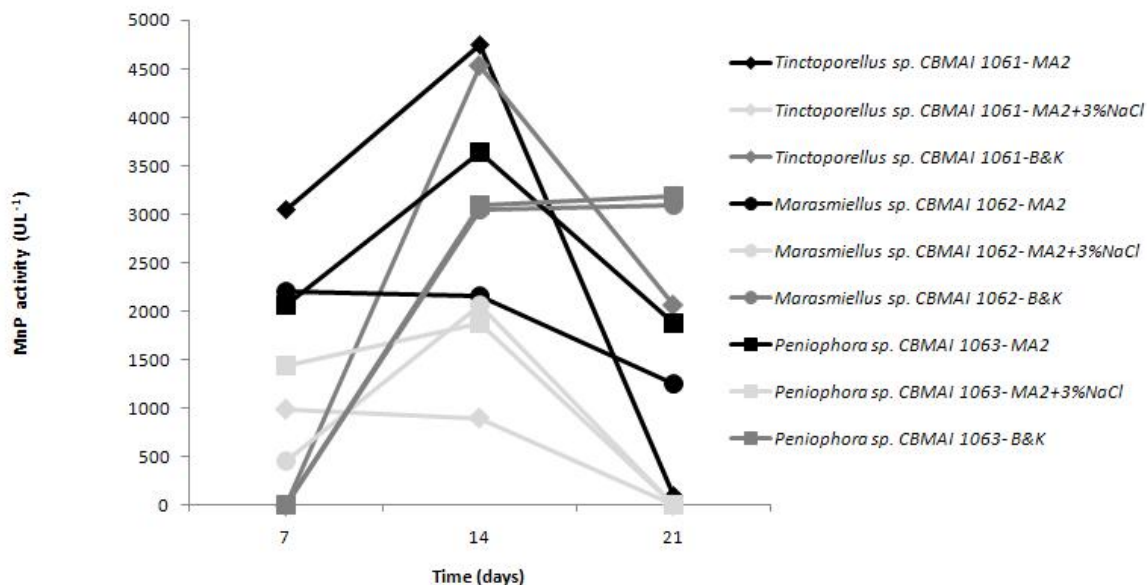
LiP was not produced by the three fungi in the medium B&K, containing glucose as carbon source. However, LiP was produced in media containing malt extract (MA2). The Figure 1 showed the results of LiP production and the time course of enzyme activity by marine-derived fungi.



**Fig 1.** LiP activity by marine-derived basidiomycetes in 7, 14 and 21 days of incubation in MA2 (black), MA2 plus 3% NaCl (gray) and MA2ASW (dark gray).

The highest activities were obtained in medium MA2 after 7 days of incubation, where more than 90,000.00 UL<sup>-1</sup> of LiP was produced by the three basidiomycete fungi. However, considerable amounts of this enzyme (> 10,000.00 UL<sup>-1</sup>) were obtained under saline conditions: medium MA2 plus 3% NaCl after 14 days, and medium MA2ASW after 7 and 14 days of incubation (Figure 1).

In medium MA2, the highest production of MnP (> 4,000.00 UL<sup>-1</sup>) were obtained after 14 days of incubation by *Tinctoporellus sp. CBMA 1061*. Similar trends of enzymatic activity were produced by the three marine-derived fungi in medium B&K after 14 days of incubation. In addition, the fungus *Peniophora sp. CBMAI 1063* showed the highest MnP activity (1,883.00 UL<sup>-1</sup>) under saline conditions (medium MA2 plus 3% NaCl) (Figure 2). MnP was not detected in the medium MA2ASW.



**Fig 2.** MnP activity by marine-derived basidiomycetes in 7, 14 and 21 days of incubation in MA2 (black), MA2 plus 3% NaCl (gray) and B&K (dark gray).

In order to enhance LiP and MnP production, the inductors guaiacol, CuSO<sub>4</sub>, o-dianisidine dihydrochloride and wheat bran, were added to the liquid media MA2 and B&K (Table 2). The addition of wheat bran enhanced LiP production by *Tinctoporellus sp. CBMAI 1061* in medium MA2 (130,215.05 UL<sup>-1</sup>). This inductor also stimulates LiP activity by *Tinctoporellus sp. CBMAI 1061* (4,193.55 UL<sup>-1</sup>) and *Peniophora sp. CBMAI 1063* (94731.18 UL<sup>-1</sup>) in medium B&K. It is important to highlight that LiP was not produced by marine-derived basidiomycetes in medium B&K without inductors. However, *Marasmiellus sp. CBMAI 1062* was not able to produce LiP when the inductors were added to the media.

The addition of wheat bran in medium MA2 enhanced MnP production from 2,001.98 UL<sup>-1</sup> to 8,206.28 UL<sup>-1</sup> by *Marasmiellus sp. CBMAI 1062*, and from 2,087.70 UL<sup>-1</sup> to 2,556.05 UL<sup>-1</sup> by *Peniophora sp. CBMAI 1063*, after 7 days of incubation. Additionally, guaiacol stimulates MnP production by *Peniophora sp. CBMAI 1063* (2,914.80 UL<sup>-1</sup>). The production of MnP was stimulated by addition of inductors in the B&K medium in 7 days of incubation for all

basidiomycete fungi; since in this same period of time and without inductors addition, this enzyme was not produced, MnP activity was only observed after the 14<sup>th</sup> day of incubation, (Figure 2). The highest values of MnP were obtained in B&K medium with addition of CuSO<sub>4</sub> and guaiacol (5,829.60 UL<sup>-1</sup> and 7,623.32 UL<sup>-1</sup>, respectively). MnP was not enhanced by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 in media MA2, and B&K in the presence of inductors.



**Table 2.** LiP and MnP activities by marine-derived basidiomycetes in media MA2 and B&K with inductors after 7 days of incubation.

LiP (UL <sup>-1</sup> )						
Inductor	MA2			B&K		
	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063
Control*	97,001.54	90,972.31	98,547.45	ND	ND	ND
o-dianisidine	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CuSO <sub>4</sub>	ND	ND	7,526.88	ND	ND	ND
Guaiacol	ND	ND	72,043.01	ND	ND	645,16
Wheat bran	130,215.05	ND	ND	4,193.55	ND	94,731.18

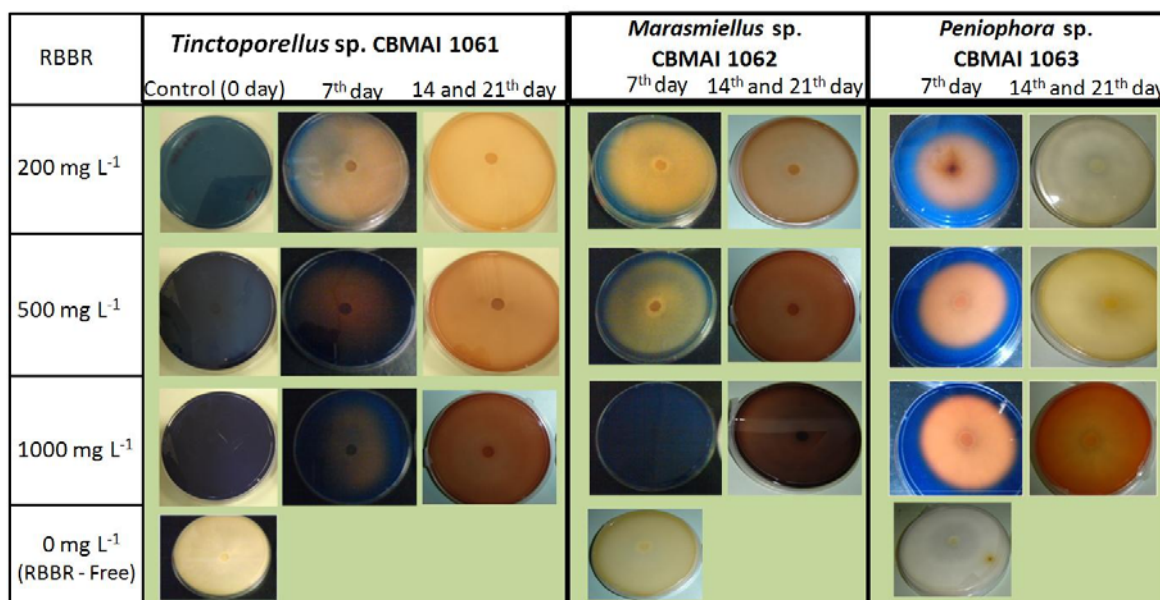
MnP (UL <sup>-1</sup> )						
Inductor	MA2			B&K		
	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063
Control*	3,097.41	2,001.98	2,087.70	ND	ND	ND
o-dianisidine	ND	1,434.90	ND	1,434.98	1,345.29	4,439.46
CuSO <sub>4</sub>	2,600.90	1,704.04	1,434.98	941.70	986.55	5,829.60
Guaiacol	ND	2,062.78	2,914.80	717.49	1,076.23	7,623.32
Wheat bran	627.80	8,206.28	2,556.05	ND	4,349.78	1,212.08

\*Control: media without inductors

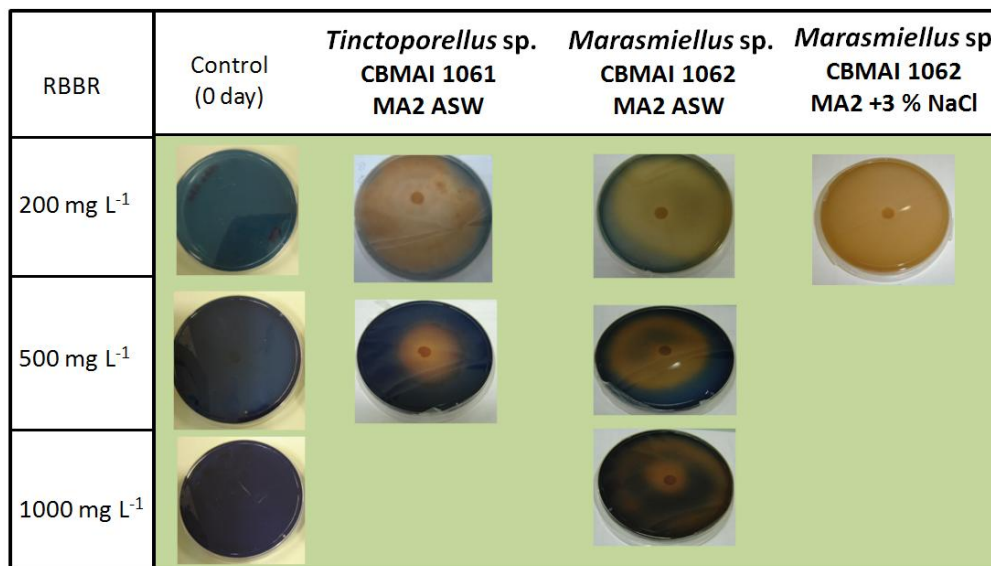
ND: Not Detected

### 3.2 Decolorization ability

Results from RBBR decolorization ability on solid media containing malt extract as carbon source, with and without salt, showed that fungal mycelia were, in general, not affected by the different dye concentrations added to the medium, since the growth diameter of mycelial colony were kind similar to the control (RBBR-free) for the three marine-derived basidiomycetes (Anexo II). The best results for growth and decolorization in solid media were obtained with the medium MA2 without salt, where after 14<sup>th</sup> day of incubation, the dye at 200 mg L<sup>-1</sup> were completely decolorized, and for the two others concentrations (500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>) the entire surface of the plate was in process of decolorization, particularly by *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (Figure 3). However, the RBBR decolorization was also effective after 21<sup>th</sup> days of incubation in saline conditions by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 in the medium with artificial seawater (MA2ASW), and by *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 in medium MA2 + 3% NaCl (Figure 4).



**Fig 3.** RBBR decolorization by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 after 7, 14 and 21 days of cultivation in solid medium MA2 without salt.

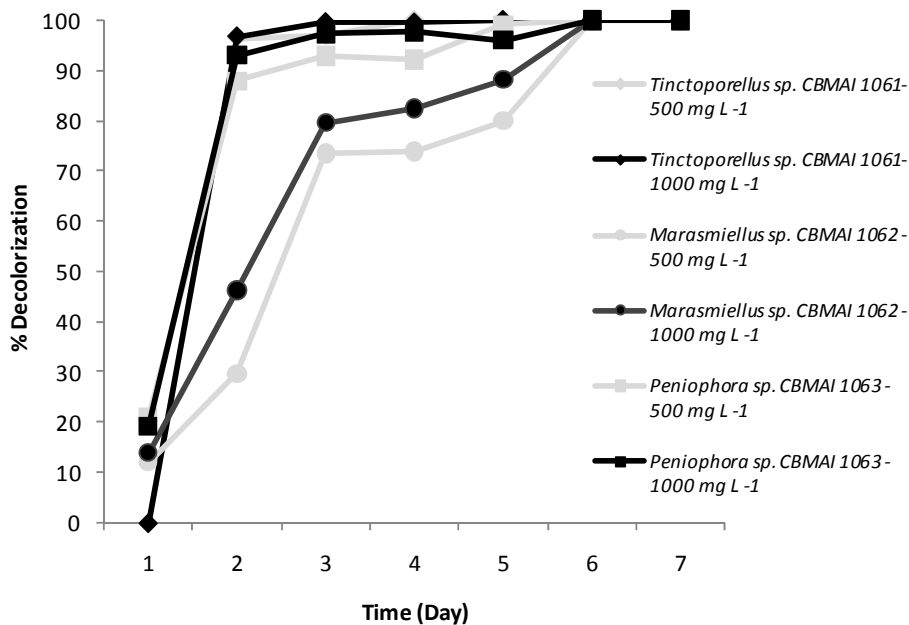


**Fig 4.** RBBR decolorization by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 after 21 days of cultivation in solid medium MA2 under saline conditions.

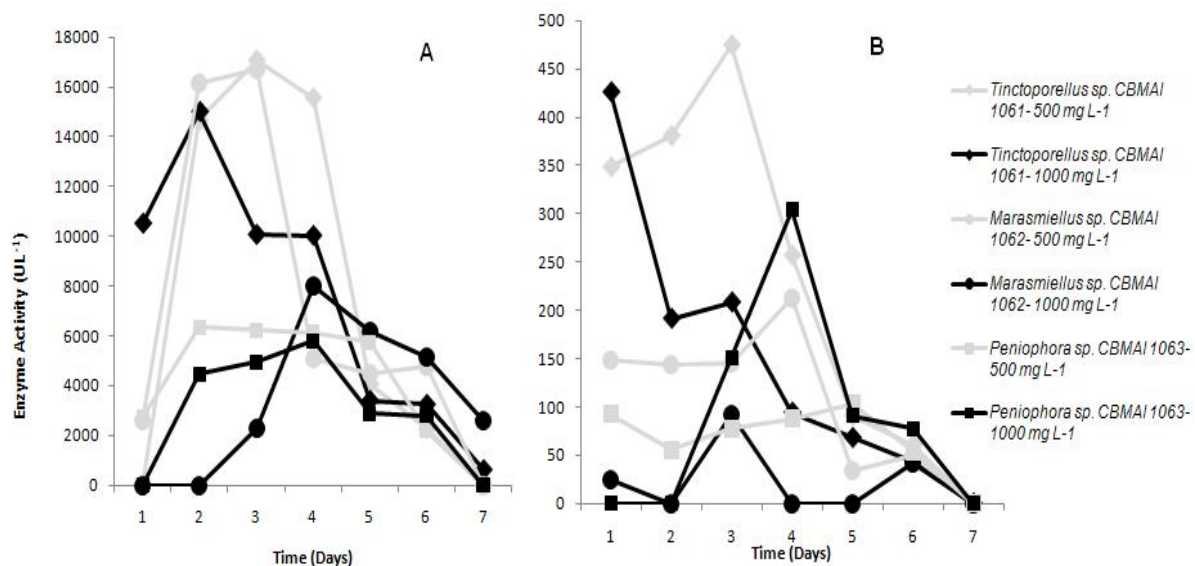
The evaluation of decolorization showed that almost total (>95%) of RBBR dye were decolorized in the 3<sup>th</sup> day by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, in both concentrations used (500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>), as showed in Figure 5. Similar results were obtained by *Peniophora* sp. CBMAI 1063 in medium containing 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup> of RBBR. On the other hand, the RBBR decolorization by *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 was slower than the decolorization by the other two fungi. Despite significant rates of decolorization (up to 75%) were achieved in the 3<sup>th</sup> day by marine-derived fungus *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, only after 6 days of incubation in liquid medium the RBBR was completely decolorized (Figure 5).

LiP activity was not detected when the strains were grow in medium with 500 and 1000 mg L<sup>-1</sup> of RBBR. Laccase was produced in less amount when compared with production detected in media without RBBR dye (Chapter 3). Nevertheless, the activity of MnP increased in the presence of RBBR and the MnP highest production was proportional to the rate of decolorization (Figure 6, Anexo III). The better production of MnP in this study was obtained by

*Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 in the 3<sup>th</sup> day of incubation, during RBBR decolorization (17,100.15 UL<sup>-1</sup>).



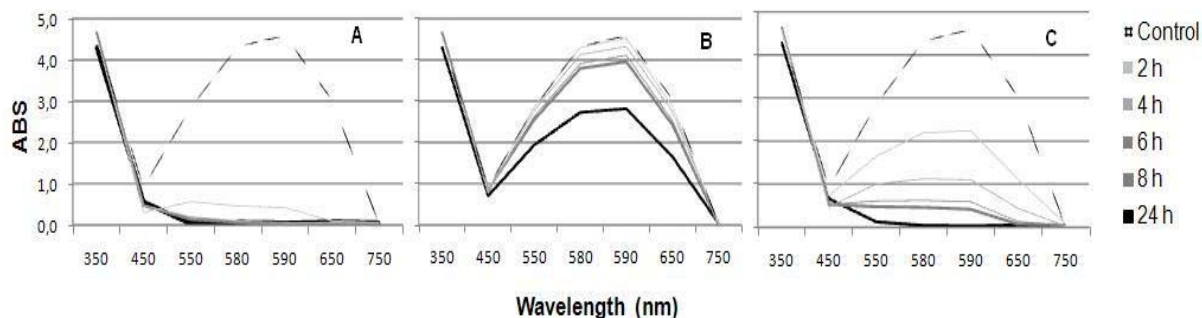
**Fig 5.** RBBR decolorization by marine-derived basidiomycetes during 7 days of incubation in medium MA2 plus RBBR dye: *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 500 mg L<sup>-1</sup> RBBR (◇); *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 1000 mg L<sup>-1</sup> RBBR (◆); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 500 mg L<sup>-1</sup> (●); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 1000 mg L<sup>-1</sup> (●); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 500 mg L<sup>-1</sup> (■); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 1000 mg L<sup>-1</sup> (■).



**Fig 6.** MnP (A) and laccase (B) activities by three marine-derived basidiomycetes in microbial decolorization during 7 days of incubation in medium MA2 plus RBBR dye: *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 500 mg L<sup>-1</sup> RBBR (◇); *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 1000 mg L<sup>-1</sup> RBBR (◆); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 500 mg L<sup>-1</sup> (●); *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 1000 mg L<sup>-1</sup> (○); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 500 mg L<sup>-1</sup> (■); *Peniophora* sp. CBMAI 1063 1000 mg L<sup>-1</sup> (■).

In general, the disappearance of color in liquid cultures could be explained by mycelial adsorption or dye transformation. For this reason and also to know the capacity of decolorization of crude enzyme extract, similar absorption spectra to those of microbial decolorization were obtained with 7-day-old mycelia-free culture supernatants (enzymatic decolorization). The absorption spectrum of control (medium MA2 containing 500 mg L<sup>-1</sup> of RBBR without inoculum) was measured in 350 – 750 nm, and the peak of dye was defined in the zone from 500 to 750 nm. The culture supernatants of the three marine-derived basidiomycetes were either measured in this range. *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 showed a decrease of 93% in the absorption spectrum after 2 h of incubation at 28°C, reaching 100% after 4 h of incubation in the same conditions (Fig. 7). After 2 h of incubation at 28°C, the fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 showed decreasing of 50% in the absorption spectrum, reaching 100% after 24 h (Fig. 7). Nevertheless, the decreasing in the absorption spectrum by

*Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 was slower in comparison with the other two marine-derived fungi, and the maximum obtained was 63% after 24 h of incubation (Figure 5).



**Fig 7.** Absorption spectra during enzymatic decolorization (mycelia-free) of RBBR by: **(A)** *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061; **(B)** *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062; and **(C)** *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Ligninolytic activity in the crude enzymatic extracts (culture supernatants) were similar for the three marine-derived basidiomycetes fungi: 179 UL<sup>-1</sup> laccase, 2,899 UL<sup>-1</sup> MnP and 96,889 UL<sup>-1</sup> LiP for *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061; 23 UL<sup>-1</sup> laccase, 2,573 UL<sup>-1</sup> MnP and 88,276 UL<sup>-1</sup> LiP for *Peniophora* sp. CBMAI 1063, and 165 UL<sup>-1</sup> laccase, 2,394 UL<sup>-1</sup> MnP and 88,898 UL<sup>-1</sup> LiP for *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062. *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 presented the highest rate of RBBR decolorization.

### 3. DISCUSSION

#### 4.1 Ligninolytic activity and induction of MnP and LiP

LiP and MnP production by the three marine-derived basidiomycetes fungi were detected in the different media studied, including the saline conditions but in low levels. However, LiP was produced in medium B&K, with glucose as carbon source, only after the addition of wheat bran, suggesting that this lignocellulosic substrate stimulated the activity of this enzyme, which

enhances the production obtained after cultivation in medium (MA2) containing malt extract as carbon source. High amounts of LiP in media with malt (MA2 + 3% NaCL) by two marine-derived ascomycetes and one zygomycete fungi were reported by Bonugli-Santos et al. (2010). According to Arora and Gill (2001), the good production of ligninolytic enzymes by fungi in the medium MA2 could be attributed to the fact that malt extract is rich in aromatic amino acids tryptophan and tyrosine. In addition, the increase in LiP production in basidiomycetes by the addition of natural or synthetic lignins (such as wheat bran) had earlier been reported (Faison and Kirk, 1985; Arora and Sandhu, 1985; Arora and Gil, 2001; Papinutti and Forchiassin, 2007), and according to Elisashvili et al. (2008), lignocellulosic substrates strongly affect the production of ligninolytic enzymes.

The higher activity for MnP was observed in media MA2 and B&K. The activity of MnP in malt extract and glucose has been well reported in the literature (Papinutti and Lechner, 2008). Results of MnP activities in B&K medium, after 7 days of incubation in the presence of inductors, suggest that the production of this enzyme in medium with glucose by marine-derived basidiomycetes studied could be directly related to the addition of compounds that can induce the enzymatic activity. However, additional studies after the 14<sup>th</sup> day should be carried out in order to investigate the enzyme increasing in the presence of glucose as carbon source.

The production of MnP was enhanced in the presence of wheat bran by *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 and in the presence of CuSO<sub>4</sub> and guaiacol by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (Table 4). These compounds have been reported as efficient inductors of MnP activity (Papinutti et al., 2003, Levin et al., 2005 and 2008; Souza et al., 2006; Songulashvili et al., 2007).

Many factors can affect ligninolytic synthesis, including concentration and type of carbon and nitrogen sources (Leahy and Colwell 1990; Souza et al., 2006). Results from the present work and from previous studies, suggest that there is a wide variation on induction depending on

the fungal strain and culture conditions (Pointing et al., 2000; Souza et al., 2006; Leonowicz et al., 2001; Elisashvili et al., 2008). In this context, it is known that LiP and MnP can express different isozymes according to the type of grown (Cullen, 1997), however, further studies are needed to determine this relationship and also if there is variation in expression in the presence of salt. Nevertheless, the activity in saline conditions is very important for application in process with high salinity, such as the treatment of textile effluents. Ligninolytic activity under saline conditions can be considered strategic in studies related to ligninolytic enzyme production by fungi, although this type of study is still at an early stage (Raghukumar, 2008). It is important to mention that this is the first report concerning production of ligninolytic enzymes by sponge-derived fungi, since the others works reported in literature are related to activity for fungi isolated mainly from mangrove (Raghukumar et al., 1994, 2002, 2008; D'Souza et al., 2006). Compared with these studies on enzymatic activity obtained in this work can be considered very expressive, although there are few studies evaluating the production of ligninolytic enzymes in salty conditions.

#### **4.2 Decolorization ability**

Marine-derived fungi are being reported as efficient fungi for decolorization of dyes, including RBBR and textile effluents (Raghukumar et al., 2002; Raghukumar et al., 2008). Since RBBR is an anthracene derivative, it has been proposed as an efficient screening method to determine ligninolytic activity and capacity of decolorization (Kiiskinen et al., 2004; da Silva et al., 2008). In the present study, results in solid media showed the different potential in saline and non-saline conditions of the three basidiomycetes for dyes decolorization.

In the liquid media, the best decolorization were obtained by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 after 3 day of incubation in both concentrations of RBBR (500 and 1000 mg L<sup>-1</sup>) followed by *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Similar results reported by Raghukumar (2008) showed the



decolorization ability of several dyes by two fungi isolated from marine environment. The highest rate of decolorization by these strains was after 3 days of incubation, however, the first isolate showed 80% of RBBR decolorization and the second 60%. In the present study, on the 3<sup>th</sup> day *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 were able to decolorize almost 100% of RBBR dye. In addition, Sánchez-López et al. (2008) verified ability to textile dye decolorization by *Tinctoporellus epimiltinus* isolated from decaying stump in solid media.

Representatives of genus *Peniophora* have been reported as able to decolorize RBBR dye (Machado et al., 2005, Barrasa et al., 2009) and to produce ligninolytic enzymes, mainly laccase (Niku-Paavola et al., 2004; Kiiskinen et al., 2004). The evaluation of RBBR decolorization by *Peniophora cinerea* showed that MnP is the mainly enzyme in the process (Machado et al., 2005). Similarly to this result, in the present study, data derived from ligninolytic enzymes production and dye decolorization, suggest that MnP is the principal enzyme responsible for RBBR decolorization by the three marine-derived fungi. High amounts of MnP ( $>14,500.00 \text{ UL}^{-1}$ ) were detected from the 2<sup>th</sup> through 4<sup>th</sup> day of *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 incubation in MA2 plus  $500 \text{ mg L}^{-1}$  of RBBR. This enzymatic peak coincides with the high rates of decolorization by this marine-derived fungus (Fig 5 and 6). Similar results were achieved for *Peniophora* sp. CBMAI 1063 and *Marasmiellus* sp. CBMAI CBMAI 1062, where the peak of MnP activities were related to the high RBBR degradation rates. Despite the production and increasing of MnP in dye decolorization process by basidiomycetes have been extensively reported in the literature (Raghukumar 2000; Dominguez et al., 2001; Levin et al., 2004; Eichlerova et al., 2006; López et al., 2008, Sharma et al., 2009; Kaushik and Malik, 2009), further studies with pure enzymes are necessary to prove conclusively the hypothesis related to MnP involvement in RBBR decolorization by the marine-derived fungi.

In order to discard the adsorption of the RBBR dye by the fungal mycelia, experiments concerning the evaluation of decreasing in the absorption spectra of crude enzymatic extracts

(mycelia-free) were carried out. Complete removal of the major visible light absorbance peak by *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 and *Peniophora* sp. CBMAI 1063 support that RBBR decolorization can be accomplished in the absence of mycelia (Figure 7). However, on the other hand, the adsorption of the dye by the mycelium must be considered for *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 that showed 100% of decolorization after 6 days of incubation (Figure 5) and only 63% of absorption spectrum decrease in the enzymatic decolorization assays (crude enzymatic extracts) (Figure 7). Additionally, in these enzymatic decolorization experiments no new absorbance peaks appeared or were moved in comparison with control (Fig 7). According to Junghanns et al. (2008), this fact could indicate that decolorization involves the same biotransformation metabolites and hence at least partly identical bioconversion pathways.

Fungi derived from marine environments are emerging as one of the best alternatives in the treatment of industrial colored effluents (Raghukumar et al., 2008; Verma et al., 2009). For that reason, the effective results obtained in the present work related to RBBR decolorization and ligninolytic enzyme production under saline and non-saline conditions stimulate new studies concerning decolorization and degradation of synthetic dyes and colored effluents, mainly from the textile industries, which are highly saline.

#### **4. CONCLUSION**

The three marine-derived basidiomycetes studied showed ability to produce large amounts of LiP and MnP in media without salt, mainly when malt extract was used as carbon source and wheat bran was used as inductor. However, ligninolytic activities in saline conditions were also very expressive. These results are valuable for several biotechnological applications. Additionally, the RBBR dye decolorization in solid media (with or without salt) and in liquid medium (without salt) by the three marine-derived basidiomycetes were very effective and enzymatic extract of these fungi also showed to be highly efficient in the dye decolorization. In

this context, they may be used in processes where the fungal cultivation could not be possible. It is worth to mention that, although there is in the literature some studies reporting the decolorization of dyes by marine-derived fungi, this is the first report that shows the ligninolytic activity in saline conditions and also the RBBR decolorization by fungi isolated from marine sponges. These salt-tolerant fungi and their salt-tolerant enzymes can be considered as a target for bioremediation of environmental pollutants in saline and non-saline conditions.

### **Acknowledgments**

The present work was supported by a grant from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 05/60175-2). R.C. Bonugli-Santos was supported by a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) fellowship.

## REFERENCES

- Arora, D.S., Sandhu, D.K. 1985. Laccase production and wood degradation by a white rot fungus *Daedalea flavida*. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 405– 8.
- Arora, D.S., Gill, P.K. 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 602–5;
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. 1996. Microbial decolorization of textile dye-containing effluents: a review. *Biores. Technol.* 58, 217–227.
- Barrasa, J.M., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 2009. Isolation and Selection of Novel Basidiomycetes for Decolorization of Recalcitrant Dyes. *Folia Microbiol.* 54 (1), 59–66.
- Bonugli-Santos, R.C., Durrant, L.R., da Silva, M., Sette, L.D. 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 32-37.
- Buswell, J.K., Cai, Y.J., Chang, S.T. 1995. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 81–8.
- Chung, K.T., Stevens, S.E. Jr, Cerniglia, C.R. 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 175–190.
- Cullen, D. 1997. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnol.* 53, 273-289.
- D'Souza, D.T., Tiwarl, R., Sah, A.K., Raghukumara, C. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 504–511.
- D'Souza-Ticlo, D., Sharma, D., Raghukumar, C. In press. A Thermostable Metal-Tolerant Laccase with Bioremediation Potential from a Marine-Derived Fungus. *Mar. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10126-009-9187-0

- Dominguez, A., Rivela, I., Couto, S.R., Sanromán, M.A. 2001. Design of a new rotation drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on inerte support. *Process Biochemistry*. 37, 549-554.
- Eichlerova', I., Homolka, L., Nerud, F. 2006. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calypratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochemistry*. 41, 941–946.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., Agathos, S.N. 2008. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 331-339.
- Enayatzamir, k., Tabandeh, F., Yakhchali, B., Alikhani, H.A., Couto, S.R. In press. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. *Journal of Hazardous Materials*. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.088.
- Faison, B.D., Kirk, T.K. 1985. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49,299 –304.
- Fu, Y., Viraraghavan, T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review, *Biores. Technol.* 79, 251–262.
- Hamid, M., Khalil-ur-Rehman. 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*. 115, 1177–1186.
- Hernández-Luna, C.E., Gutiérrez-Soto, G., Salcedo-Martínez, S.M. 2008. Screening for decolorizing basidiomycetes in Mexico. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 465–473.
- Junghanns, C., Krauss, G. and Schlosser, D. 2008. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresour. Technol.* 99, 1225–1235.

- Kaushik, P., Malik, A. 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environment International*. 35, 127–141.
- Kiiskinen, L. -L., Rättö, M., Kruus, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *J. Appl. Microbiol.* 97, 640–646.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247–50.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990. *Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment*. *Microbiol. Rev.* 54, 3.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewsha, A., Hofrichter, M., Wesernberg, D., Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbial.* 41(4), 185-227.
- Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F. 2004. Evaluation of Argentinean white-rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresour. technol.* 94, 169-176.
- Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A. 2005. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process. Biochem.* 40,1381–7.
- Levin, L., Herrmann, C., Papinutti, V.L. 2008. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 39, 207–14.
- López, C., Moreira , M.T., Feijoo, G., Lema, J.M. 2008. Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor. *Biotechnol. Progress.* 20, 74 – 81.

- López, M. J., Guisado, G., Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F. and Moreno, J. 2006. Decolourisation of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 42–45.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R., Bononi, V.L.R. 2005. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. *Brazilian Journal of Microbiology.* 36,246-252.
- Menezes, C.B., Bonugli-Santos, R.C., Miqueletto, P.B., Passarini, M.R.Z., Silva, C.H.D., Justo, M.R., Leal, R.R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Berlinck, R.G.S., Sette, L.D. In press. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiol. Res.* doi:10.1016/j.micres.2009.09.005.
- Niku-Paavola, M.-L., Fagerström, R., Kruus, K., Viikari, L. 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 100-102.
- Palmieri, G., Cennamo, G. and Sannia, G., 2005. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 17–24.
- Papinutti, V.L., Diorio, L.A., Forchiassin, F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 157–60.
- Papinutti, L., Forchiassin, F. 2007. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J. Food Eng.* 81,54–59.
- Papinutti, L., Lechner, B. 2008. Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35, 1715–1721.

- Pointing, S.B., Vrijmoed, L.L.P., Jones, E.B.G. 1998. A qualitative assessment of lignocelluloses degrading activity in marine fungi. *Botanica Marina*. 41:290-298.
- Pointing, S.B., Jones, E.B.G., Vrijmoed, L.L.P. 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia*. 92,139–144.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'Souza, T.M., Reddy, C.A. Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. *Botanica Marina*, 37: 515-523, 1994.
- Raghukumar, C. 2000. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycol. Res.* 104, 1222–1226.
- Raghukumar, C. 2002. Bioremediation of coloured pollutants by terrestrial versus facultative marine fungi. In: *Fungi in Marine Environment*. (ed. K.D. Hyde) Fungal Diversity Research Series 7: 317-344.
- Raghukumar, C. 2008. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity* 31, 19-35.
- Raghukumar, C., D'Souza-Ticlo, D., Verma, A.K. 2008. Treatment of Colored Effluents with Lignin-Degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-Derived Fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 34,189–206.
- Sánchez-López, M.I., Vanhulle, S.F., Mertens, V., Guerra, G., Figueroa, S.H., Decock, C., Corbisier, A-N., Penninckx, M.J. 2008. Autochthonous white rot fungi from the tropical forest: Potential of Cuban strains for dyes and textile industrial effluents decolourisation. *Afr. J. Biotechnol.* 7 (12), 1983-1990.
- Sharma, P., Singh, L., Dilbaghi, N. 2009. Biodegradation of Orange II dye by *Phanerochaete chrysosporium* in simulated wastewater. *J. Sci. Ind. Res.* 68, 157-161.
- Sette LD, Oliveira VM de, Rodrigues MFA, 2008. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microbiol Australia*. 29: 18-20.



- da Silva, M., Passarini, M.R.Z., Bonugli, R.C., Sette, L.D., 2008. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environ. Technol.* 29, 1331-1339.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E., Hadar, Y. 2007. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 57–61.
- Souza, D.F., Tychanowicz, G.K., De Souza, C.G.M., Peralta, R.M. 2006. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *J. Basic Microbiol.* 46, 126–34.
- Verma, A.K., Raghukumar, C., Verma, P., Shouche, Y.S., Naik, C.G. In press. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. *Biodegradation*. DOI 10.1007/s10532-009-9295-6.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da técnica de ARDRA, juntamente com a caracterização taxonômica dos fungos filamentosos isolados de cnidários marinhos, permitiu o conhecimento da diversidade deste grupo de micro-organismos, tão pouco estudado no Brasil e no mundo. Os fungos filamentosos foram caracterizados como pertencentes ao filo Ascomycota, distribuídos em 6 ordens e 13 gêneros, sendo identificado apenas um único isolado do gênero *Mucor* sp., filo Zygomycota.

A triagem da atividade ligninolítica, bem como as análises estatísticas dos fungos derivados de cnidários marinhos, foi altamente produtiva e revelou o potencial dos fungos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847 na bioremediação de poluentes ambientais e aplicações biotecnológicas em condições salinas. Em adição, este foi o primeiro trabalho a demonstrar a produção de enzimas ligninolíticas por um fungo zigomiceto do gênero *Mucor*.

Os estudos de indução e da interferência da fonte de carbono (extrato de malte e glicose) na produção das enzimas ligninolíticas revelaram que, tanto os ascomicetos e zigomicetos isolados de cnidários marinhos, quanto os fungos basidiomicetos isolados de esponjas marinhas foram afetados por estes parâmetros. O meio de cultivo contendo extrato de malte como fonte de carbono foi o que mostrou atividade ligninolítica mais alta para os basidiomicetos, em ambas as condições salina e não-salina.

A análise de caracterização dos genes que codificam para a lacase resultou na detecção de uma elevada diversidade de genes entre os três fungos basidiomicetos estudados. Todos os isolados apresentaram pelo menos duas sequências gênicas distintas de lacase, sugerindo a presença de novas lacases, as quais podem apresentar características diferentes das lacases de micro-organismos terrestres.

O potencial biotecnológico dos basidiomicetos derivados marinhos foi evidenciado na descoloração do corante RBBR. Uma eficiente descoloração deste corante foi obtida após 3, 4 e 6 dias de cultivo dos fungos *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061, *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Marasmiellus* sp. CBMA 1062, respectivamente. Os resultados de descoloração e produção enzimática sugerem que a MnP é, provavelmente, a principal enzima envolvida na descoloração do RBBR. Em adição, o extrato enzimático bruto dos fungos basidiomicetos mostrou também ser um potencial método em processos de descoloração onde os micro-organismos não podem ser cultivados.

A atividade ligninolítica e de descoloração obtidas pelos fungos derivados marinhos em condições salinas tornam esses micro-organismos fontes potenciais de recursos genéticos para aplicação em processos de biorremediação de diversos poluentes ambientais, incluindo os efluentes de indústrias têxteis, que são característicos pela presença de altos teores de corantes e valores extremos de sal e pH; e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), derivados de derramamento acidental de petróleo no ambiente marinho.

De maneira geral, pode-se concluir que os objetivos propostos no presente trabalho foram concluídos com êxito. A combinação dos dados obtidos contribui para ampliação do conhecimento da diversidade microbiana associada aos invertebrados marinhos e do potencial biotecnológico destes isolados, principalmente na biorremediação de ambientes salinos e não-salinos impactados.

**Anexo I**

LiP and MnP activities by marine-derived basidiomycetes in 7, 14 and 21 days of incubation in MA2, MA2 plus 3%NaCl and MA2ASW for LiP and B&K for MnP.

Strain	LiP (UL <sup>-1</sup> )								
	MA2			MA2+3%NaCl			MA2ASW		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
<i>Tinctoporellus sp.</i> CBMAI 1061	97,634.41	8,172.04	26,451.61	6,677.4	25,806.45	0	14,194.55	11,290.32	5,376.34
<i>Marasmiellus sp.</i> CBMAI 1062	91,613.90	14,838.71	13,440.86	6,645.1	13,548.39	0	13,978.49	12,366.59	11,61.90
<i>Peniophora sp.</i> CBMAI 1063	100,645.16	0	0	9,451.1	14,731	0	11,720.43	0	0

Strain	MnP (UL <sup>-1</sup> )								
	MA2			MA2+3%NaCl			B&K		
	7	14	21	7	14	21	7	14	21
<i>Tinctoporellus sp.</i> CBMAI 1061	3,049.33	4,753.36	89.7	986.55	896.86	0	0	4,529.1	2,062.78
<i>Marasmiellus sp.</i> CBMAI 1062	2,197.31	2,152.47	1,256.61	448.43	2,062.78	0	0	3,049.3	3,094.17
<i>Peniophora sp.</i> CBMAI 1063	2,062.78	3,632.29	1,883.41	1,434.98	1,883.41	0	0	3,094.2	3,183.86

## Anexo II

Decolorization and growth characteristics of marine-derived basidiomycetes cultivated on solid media.

Media and Dye concentrations	Strain CBMAI number*	Time of incubation					
		7 days		14 days		21 days	
		Growth <sup>a</sup>	Decoloriz. <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Decoloriz. <sup>b</sup>	Growth <sup>a</sup>	Decoloriz. <sup>b</sup>
<b>MA2 Control (RBBR-free)</b>	1061	Total	0	Total	0	Total	0
	1062	Total	0	Total	0	Total	0
	1063	7	0	Total	0	Total	0
<b>MA2 200 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	Total	4	Total	Total	Total	Total
	1062	Total	6.6	Total	Total	Total	Total
	1063	7	5.1	Total	Total	Total	Total
<b>MA2 500 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	7	6.1	Total	Total	Total	Total
	1062	Total	6.6	Total	Total	Total	Total
	1063	7	5.6	Total	Total	Total	Total
<b>MA2 1000 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	7	4.5	Total	Total	Total	Total
	1062	Total	0	Total	Total	Total	Total
	1063	7	6	Total	Total	Total	Total
<b>MA2ASW Control (RBBR-free)</b>	1061	5,4	0	Total	0	Total	0
	1062	Total	0	Total	0	Total	0
	1063	3	0	5,3	0	6,2	0
<b>MA2ASW 200 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	4,6	0	Total	2	Total	6
	1062	Total	0	Total	2,5	Total	7
	1063	3,3	0	4,6	0	6	0
<b>MA2ASW 500 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	4	0	5,1	0	5,6	4,5
	1062	Total	0	Total	0	Total	5,8
	1063	3,8	0	5,3	0	6,2	0
<b>MA2ASW 1000 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	5,2	0	Total	0	Total	4,6
	1062	Total	0	Total	0	Total	3,6
	1063	3,2	0	5,6	0	6	0
<b>MA2+3%NaCl Control (RBBR-free)</b>	1061	1	0	1,6	0	1,8	0
	1062	Total	0	Total	0	Total	0
	1063	0	0	2	0	3,5	0
<b>MA2+3%NaCl 200 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	1	0	3,5	0	4,8	0
	1062	Total	0	Total	0	Total	
	1063	0	0	2,3	0	2,8	0
<b>MA2+3%NaCl 500 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	1,2	0	2,2	0	3,2	0
	1062	Total	0	Total	0	Total	3
	1063	1	0	2,3	0	3	0
<b>MA2+3%NaCl 1000 mg L<sup>-1</sup></b>	1061	1	0	1,2	0	2,3	0
	1062	Total	0	Total	0	Total	0
	1063	1	0	2,3	0	3	0

aGrowth: the number represents the diameter of the mycelial colony (cm)

b Decolorization: the number represents the diameter of the decolorized zone (cm) - Total: growth in the entire length of the Petri dishes.

\*Strains CBMAI 1061 = *Tinctoporellus* sp.; CBMAI 1062 = *Marasmiellus* sp.; and CBMAI 1063 = *Peniophora* sp.

### Anexo III

Microbial decolorization of RBBR and corresponding laccase and MnP production by three marine-derived basidiomycetes

<i>Tinctoporellus</i> sp. CBMAI 1061						
500 mg L <sup>-1</sup>				1000 mg L <sup>-1</sup>		
Time (day)	Decolorization (%)	MnP UI <sup>-1</sup>	Lac UI <sup>-1</sup>	Decolorization (%)	MnP UI <sup>-1</sup>	Lac UI <sup>-1</sup>
1	0	10,044.84	348,77	0	10523,17	425,93
2	96,44	14678,62	381,23	96,73	15007,47	191,36
3	96,91	17100,15	475,31	99,55	10074,74	208,33
4	100	15575,49	257,2	99,48	10034,00	94,14
5	100	4065,77	91,05	100	3408,07	67,90
6	100	2272,05	60,19	100	3251,44	43,21
7	100	0	0	100	627,80	0,00

<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062						
500 mg L <sup>-1</sup>				1000 mg L <sup>-1</sup>		
Time (day)	Decolorization (%)	MnP UI <sup>-1</sup>	Lac UI <sup>-1</sup>	Decolorization (%)	MnP UI <sup>-1</sup>	Lac UI <sup>-1</sup>
1	11,96	2600,90	148,15	13,85	0	24,69
2	29,69	16128,55	143,75	46,24	0	0
3	73,48	16714,14	145,06	79,53	2272,048	92,59
4	73,87	5082,21	212,96	82,43	8026,906	0
5	79,97	4484,30	33,95	88,11	6182,362	0
6	100	4753,36	49,38	100	5171,898	41,67
7	100	0	0	100	2600,897	0

<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063						
500 mg L <sup>-1</sup>				1000 mg L <sup>-1</sup>		
Time (day)	Decolorization (%)	MnP UI <sup>-1</sup>	Lac UI <sup>-1</sup>	Decolorization (%)	MnP UI <sup>-1</sup>	Lac UI <sup>-1</sup>
1	21,06	2720,48	92,59	19,24	0	0
2	87,97	6337,82	55,56	93,01	4454,41	0
3	92,87	6214,17	77,16	97,30	4946,19	151,23
4	92,16	6128,55	87,92	97,63	5784,75	304,01
5	99,13	5739,91	103,40	96,00	2869,96	91,05
6	100	2182,36	54,01	100	2780,27	77,16
7	100	0	0	100	0	0