

# PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS CON HONGOS BASIDIOMICETOS CULTIVADOS SOBRE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

## PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM BASIDIOMYCETE FUNGI ON LIGNOCELLULOSIC MATERIALS

Juan C. QUINTERO D.<sup>1\*</sup>, Gumersindo FEIJOO C.<sup>2</sup> y Juan M. LEMA R.<sup>2</sup>

Recibido: Julio 10 de 2006 Aceptado: Octubre 3 de 2006 de 2006

### RESUMEN

Los hongos de podredumbre blanca de la madera tienen la capacidad de producir un complejo enzimático con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas recalcitrantes como plaguicidas, tintes, hidrocarburos poliaromáticos, explosivos, etc., que contaminan suelos y cuerpos de agua. Su propagación sobre suelos contaminados, la producción de enzimas ligninolíticas y la biodegradación de contaminantes, se favorece cuando estos hongos se inoculan en el suelo mezclados con materiales lignocelulósicos que les suministran la fuente de carbono necesaria para sostener su crecimiento e inducir la producción del complejo enzimático. Este trabajo muestra la capacidad para producir las enzimas ligninolíticas manganeso peroxidasa (MnP) y lignino peroxidasa (LiP) en cultivos de los hongos *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* sobre tres materiales lignocelulósicos: viruta de madera, carozo de maíz y compost de jardinería. De estos materiales, la viruta de madera permitió alcanzar los mayores títulos de la enzima MnP, con valores de 5,0 U/g de material seco cuando se cultiva con *Bj. adusta* y de 1,3 U/g de material seco con *P. chrysosporium*, mientras que con carozo de maíz se obtienen las mejores actividades de LiP. Estos materiales se mostraron adecuados para favorecer la producción de enzimas ligninolíticas para ser empleados como soportes en la inoculación de hongos sobre suelos contaminados.

**Palabras clave:** hongos de la madera, fermentación sólida, enzimas ligninolíticas, biorremediación, suelos.

### ABSTRACT

White rot fungi produce a ligninolytic enzymatic complex with capacity to degrade a wide spectrum of toxic and recalcitrant substances as plaguicides, dyes, polyaromatic hydrocarbons, explosives, etc., which cause pollution in soils and water bodies. The grown-on soil fungi's ligninolytic enzyme production and contaminant biodegradation are favorable when fungi are inoculated with a mixer of pieces of lignocellulosic material in soil. These materials provide carbon source to maintain growth and induce enzymatic complex. Fungi *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium* were employed to evaluate pieces of wood, corn cob and compost in order to produce ligninolytic enzymes manganese peroxidase (MnP) and lignine peroxidase (LiP). Pieces of wood provide an adequate support for production of MnP until 5.0 U/g dry material with *Bj. adusta* and 1.3 U/g dry material with *P. chrysosporium*. Corn cobs provide the best LiP activities. Ligninolytic enzymes only were detected in soil, when fungus was inoculated attached in these ligninolytic materials. These materials are appropriate for ligninolytic enzymes production and to inoculate fungus on contaminated soils.

**Keywords:** wood fungi, solid fermentation, ligninolytic enzymes, bioremediation. Soil.

---

1 Grupo de Bioprocesos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Antioquia, Calle 67 No 53-108, Medellín, Colombia.

2 Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Compostela, España

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: jcquinte@udea.edu.co

## INTRODUCCIÓN

La lignina es un biopolímero aromático complejo; es el segundo polímero en abundancia después de la celulosa, constituye cerca del 15% de la biomasa terrestre y su fuente natural es la madera, donde se encuentra en una proporción del 20 al 35%. Solamente un pequeño número de microorganismos son responsables de la biodegradación de la lignina, de los cuales los hongos de la podredumbre blanca constituyen el grupo más importante, gracias a que producen unas enzimas ligninolíticas extracelulares, lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), que tienen una potente capacidad oxidante (1). En la degradación enzimática de la lignina intervienen una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero y dan como resultado la desestabilización de los enlaces y finalmente la ruptura de la macromolécula (2).

Los hongos de la podredumbre blanca de la madera, también llamados hongos ligninolíticos, así como sus enzimas ligninolíticas, tienen potencial aplicación en la industria del papel, principalmente en el proceso de deslignificación durante el blanqueo, y en biorremediación de suelos y aguas contaminadas, porque la baja especificidad de estas enzimas les permite oxidar, además de la lignina, una amplia variedad de compuestos orgánicos contaminantes como tintes, hidrocarburos poliaromáticos, pentaclorofenol, etc. (3).

Algunos de los factores más importantes que se deben tener en cuenta en las tecnologías de biorremediación de suelos contaminados con hongos ligninolíticos, son: Alcanzar una abundante colonización del suelo, mantener su crecimiento por un periodo prolongado de tiempo y favorecer la producción de enzimas ligninolíticas. Además, que su desarrollo no sea impedido por la microflora antagonista predominante (4).

En biorremediación de suelos, los hongos ligninolíticos normalmente son aplicados en forma de micelio crecido sobre viruta de madera, paja de trigo, carozo de maíz, o algún otro material lignocelulósico similar. Esta forma de inoculación permite obtener una abundante colonización del suelo, sostener su crecimiento por un periodo prolongado de tiempo dado su aporte de carbono y favorecer la producción de enzimas ligninolíticas, puesto que con estos materiales se tiende a simular su nicho ecológico natural.

En esa dirección se han enfocado trabajos tendientes a evaluar diferentes matrices sólidas sobre las cuales inmovilizar y multiplicar el hongo, que les sean útiles como fuente de carbono y que tengan bajo costo (5). Se han probado matrices tales como: granos de maíz (6), paja de trigo, papel periódico, papel absorbente, palomitas de maíz, harina de maíz (7), trozos de madera (8), granos de centeno, cáscara de trigo, salvado de trigo (9), bagazo de caña de azúcar (10), pulpa de remolacha azucarera (11), entre otros. Sin embargo, existe poca información sobre la producción de enzimas ligninolíticas de los hongos de podredumbre de la madera en estos materiales y más aún sobre la producción en suelos inoculados con este tipo de hongos (12;13).

Este trabajo está orientado a evaluar la capacidad que tienen tres materiales lignocelulósicos diferentes para favorecer la producción de enzimas ligninolíticas de dos hongos basidiomicetos en sistemas de fermentación en fase sólida y en sistemas de cultivo sobre suelos forestales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Los microorganismos

Se usaron las cepas *Phanerochaete chrysosporium* y *Bjerkandera adusta* de la colección de cultivos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (España). Se mantuvieron en slants de agar con extracto de malta y peptona a 4°C. A partir de ese momento, fueron transferidas a placas de Petri (10,0 g/L de glucosa, 3,5 g/L de extracto de malta y 15,0 g/L de agar) y llevadas a incubación durante 5 días. Las temperaturas de incubación para *Bj. adusta* y *P. chrysosporium* fueron siempre de 30 y 37°C respectivamente. La preparación de los inóculos para todos los experimentos se llevó a cabo transfiriendo 5 trozos circulares de agar colonizado desde las cajas de Petri a Fernsbach de 1L con 100 mL de medio de cultivo (14), e incubando durante 5 días.

### Cultivos en fase sólida

La evaluación de la producción de enzimas ligninolíticas se realizó en tres sistemas de fermentación en estado sólido, en frascos Erlenmeyers de 100 mL. 1) Se emplearon por separado los materiales lignocelulósicos: carozo de maíz, viruta de madera y compost de jardinería. Se mezcló 1,25 g del material seco estéril en trozos de 0,5 cm de diámetro promedio, con 6,0 mL de medio de cultivo y 4,0

mL de inóculo homogenizado. 2) Se empleó suelo forestal tomado a 15 cm de profundidad, de textura franco-arenoso. 10 g de suelo seco estéril (tamaño de partícula menor de 2 mm) con 4,5 mL de inóculo homogenizado. 3) El tercer sistema fue una mezcla de 10 g de suelo seco y estéril (tamaño de partícula menor de 2 mm) con 1,25 g de carozo de maíz estéril en trozos de 0,5 cm de diámetro promedio, 6,0 mL de medio de cultivo y 4,5 mL de medio de inóculo.

Los cultivos se incubaron a la temperatura adecuada para cada hongo; periódicamente se retiraron frascos para analizar la actividad ligninolítica de los sistemas y la degradación del sustrato sólido; a los frascos restantes se les controló la humedad de acuerdo con su pérdida de peso.

### Extracción y medición de la actividad enzimática

La extracción de las enzimas se realizó adicionando a cada frasco de cultivo 10 mL de solución de malonato de sodio (10 mM, pH 4,5) y agitando vigorosamente en un agitador recíproco a 300 osc/min durante 5 minutos. El líquido sobrenadante se centrifugó a 6000 rpm y se filtró a través de una membrana de 0,45 micras antes de determinar su actividad enzimática.

La actividad manganeso peroxidasa (MnP) se determinó a partir de la oxidación del compuesto 2,6 dimetoxifenol (2,6-DMP) a 468 nm (15). La mezcla de reacción consta de 50 mM de malonato de sodio (pH=4,5), 1mM de dimetoxifenol, MnSO<sub>4</sub>, 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μL de muestra y agua destilada. Una unidad de actividad representa 1 μmol de producto oxidado de DMP por minuto. La actividad LiP se determinó mediante la oxidación de alcohol veratrílico a aldehído veratrílico a 310 nm (14). La mezcla de reacción consta de de 50 mM de tartrato de sodio (pH= 3,0), 2 mM de alcohol veratrílico, 0,4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μL de muestra y agua destilada.

### Degradación de los materiales lignocelulósicos

La degradación de los tres materiales lignocelulósicos en los cultivos de los hongos se determinó retirando el líquido lixiviado de cada matraz por filtración al vacío y determinando el peso seco del sólido remanente. La diferencia de peso respecto al valor inicial representa la cantidad de material degradado.

### Determinación de sólidos volátiles

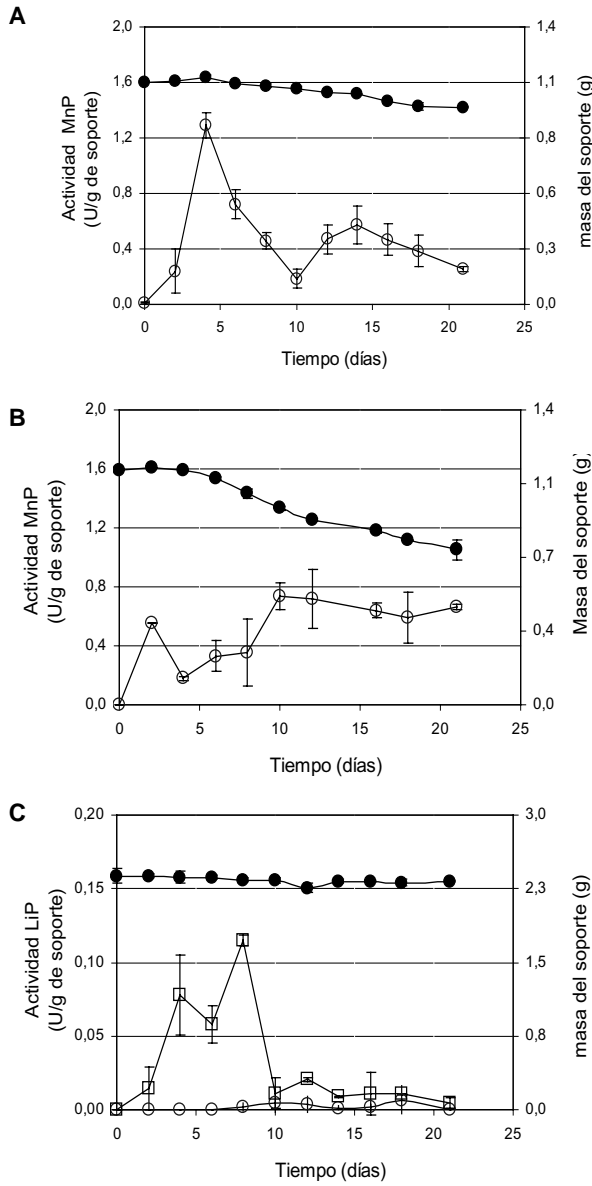
Una vez seco el material sólido de cada muestra, como se indicó en el anterior apartado, se calcinó a 550°C durante 2 h. La diferencia de peso entre el peso seco y el peso calcinado representa los sólidos volátiles de la muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Producción de enzimas sobre materiales lignocelulósicos

Se evaluó la producción de enzimas MnP y LiP con *P. chrysosporium* y *Bj. adusta* sobre tres materiales lignocelulósicos diferentes: Carozo de maíz, viruta de madera y compost de jardinería. En los cultivos de *P. chrysosporium* sólo se observó producción de MnP con viruta de madera y carozo de maíz, mientras que en compost sólo se detectó LiP (Véase figura 1). Con viruta de madera, la mayor producción de MnP se observó el día cuarto, alcanzando un valor de 1,3 U/g de soporte seco. Posteriormente, se observó una disminución de la actividad hasta perderse el 75% de su valor máximo al final del día 21. Con carozo de maíz, la producción de MnP llegó a 0,8 U/g de soporte el día 10, valor que se mantuvo estable hasta el final del experimento. En compost se detectaron bajas concentraciones de LiP, del orden de 0,1 U/g de soporte seco y no se detectó actividad MnP.

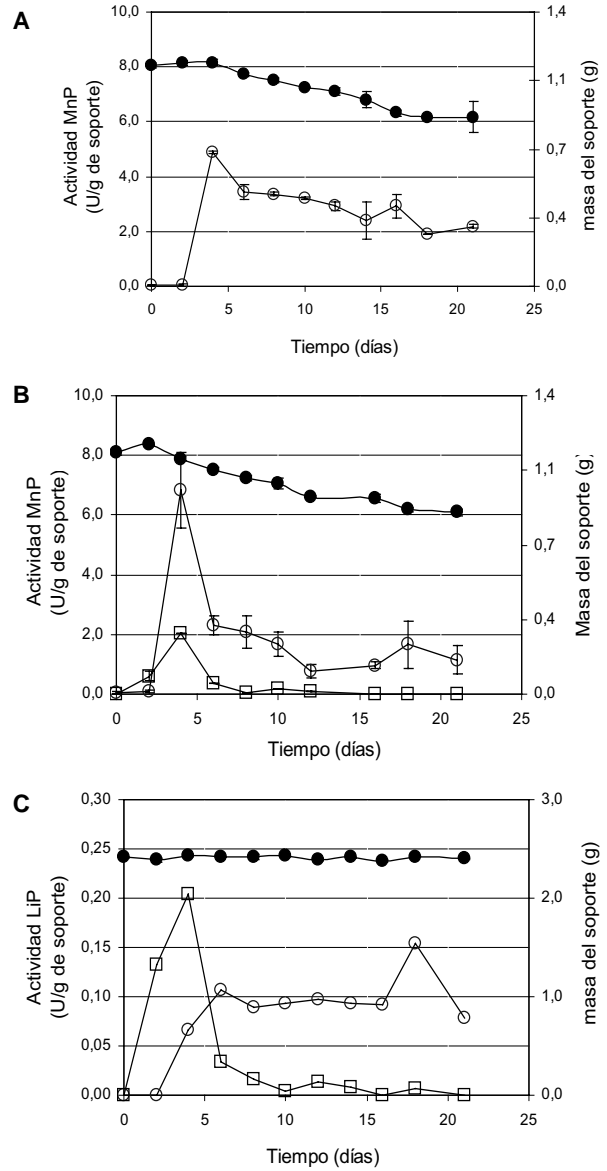
La relación C/N de estos materiales es del orden de 300-400 para la madera, 70 para el carozo de maíz y 20 para el compost, lo cual explica la mayor producción de MnP en la madera y la menor en compost, dado que en *P. chrysosporium*, esta enzima se expresa en condiciones de limitación de nitrógeno (14), que en este caso se encuentra en la viruta de madera, atendiendo a que la relación estequiométrica adecuada para microorganismos es de 10/1. Los resultados de producción de MnP con *P. chrysosporium* guardan relación con la reducción de la masa de material insoluble, puesto que los residuos lignocelulósicos son degradados por las enzimas producidas. El compost, donde se observó muy baja producción de enzimas, no fue degradado, mientras que en viruta de madera y carozo de maíz, se alcanzó una reducción en la masa de material lignocelulósico del 10% y del 35% respectivamente, tras los 21 días de cultivo (Véase figura 1).



**Figura 1.** Producción de enzimas ligninolíticas con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en cultivos en fase sólida sobre tres materiales lignocelulósicos diferentes: (A) viruta de madera, (B) carozo de maíz y (C) compost de jardinería. Símbolos: (●) Masa de soporte lignocelulósico; (○) Actividad MnP (Unidades/g de soporte); (□) Actividad LiP (Unidades/g de soporte).

La producción de MnP con *Bj. adusta* en todos los soportes fue hasta ocho veces superior a la alcanzada con *P. chrysosporium* (Véase figura 2). Además, con *Bj. adusta* se detectó actividad LiP en carozo de maíz y actividad MnP en compost que no se habían detectado con *P. chrysosporium*. MnP y LiP son comunes en los hongos de la podredumbre blanca; sin embargo, varias especies como *P. chrysosporium* producen MnP y baja cantidad de LiP (16). La producción de MnP con *Bj. adusta* en compost

que contiene exceso de nitrógeno, contrasta con la nula producción obtenida con *P. chrysosporium*, y se explica porque la producción de MnP en *Bj. adusta* no está regulada por limitación de nitrógeno (17).



**Figura 2.** Producción de enzimas ligninolíticas con el hongo *Bjerkandera adusta* en cultivos en fase sólida sobre tres diferentes materiales lignocelulósicos: (A) viruta de madera, (B) carozo de maíz y (C) compost de jardinería. Símbolos: (●) Masa de soporte lignocelulósico; (○) Actividad MnP (Unidades/g de soporte); (□) Actividad LiP (Unidades/g de soporte).

No se observó correlación directa entre la producción de enzima y la degradación de los materiales lignocelulósicos. *P. chrysosporium* degradó una mayor cantidad de carozo de maíz con una

menor producción de enzima respecto a *Bj. adusta*. Este fenómeno ya se ha observado en pruebas de bioblanqueo de pasta de papel, donde mayores actividades alcanzadas en algunos cultivos de *Bj. adusta*, no proporcionan un mayor potencial de bioblanqueo (18).

Existen pocos estudios relacionados con la producción de enzimas ligninolíticas sobre residuos lignocelulósicos; aunque estos materiales se hayan utilizado ampliamente para permitir la propagación de los hongos y favorecer las condiciones de biorremediación del suelo (11;19). La paja de trigo es el sustrato más usado en biorremediación de suelos para la propagación de hongos de la putrefacción blanca; lo que ha conducido a realizar estudios de producción de enzimas ligninolíticas sobre este material. La fermentación en estado sólido de *P. chrysosporium* sobre este sustrato esterilizado en autoclave, ha producido actividades LiP y MnP de 4,16 y 2,2 U/g de soporte seco respectivamente (20), mientras que su producción disminuye drásticamente a valores de 0,095 y 0,49 U/g de soporte seco para LiP y MnP respectivamente cuando se inocula sobre sustrato no estéril (21).

Otros hongos como *Nematoloma frowardii*, cultivados en paja de trigo, producen MnP con actividades tan altas como 16 U/g de soporte seco (22). Bajo condiciones estériles, la paja de trigo ha demostrado ser mejor sustrato que los aquí ensayados; sin embargo, por razones de disponibilidad de materiales lignocelulósicos en diferentes regiones, el carozo de maíz y la viruta de madera pueden considerarse como los sustratos que se deben emplear para la propagación y producción de enzimas de hongos de podredumbre de la madera.

Desafortunadamente no todos los trabajos permiten comparar sus resultados con los obtenidos en este trabajo, debido a las diferentes unidades en que se presentan. Por ejemplo, en un estudio de producción de MnP y LiP sobre carozo de maíz, *P. chrysosporium* produjo actividades entre 100 y 500 U/L (12;23), sin embargo, es este trabajo no se presenta la relación entre la cantidad de líquido y la masa de sólido seca que se empleó en los experimentos.

Los valores máximos encontrados de las enzimas MnP y LiP como resultado de los cultivos de *P. chrysosporium* y *Bj. adusta* en los tres materiales lignocelulósicos evaluados se pueden ver en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Producción de enzimas ligninolíticas en cultivos en fase sólida con diferentes materiales lignocelulósicos .

Matriz	Viruta de madera		Carozo de maíz		Compost de jardinería		Suelo estéril		Suelo estéril con carozo	
	Pc.	Bj.	Pc.	Bj.	Pc.	Bj.	Pc.	Bj.	Pc.	Bj.
MnP <sup>(1)</sup>	1,3	5,0	0,8	6,4	0	0,13	ND	ND	0	0,05
LiP <sup>(1)</sup>	0	0	0	2,0	0,13	0,21	ND	ND	0,06	0

(1) U/g de soporte seco o g de suelo seco

Pc: *Phanerochaete chrysosporium*; Bj. *Bjerkandera adusta*; ND: No detectado

### Producción de enzimas sobre suelo

*P. chrysosporium* y de *Bj. adusta* se inocularon en forma libre y en forma inmovilizada con carozo de maíz, sobre una matriz de suelo. Sobre el suelo inoculado en forma libre con *P. chrysosporium* se observó abundante colonización a partir del segundo día, que fue confirmada por un aumento de 20% en la cantidad de sólidos volátiles tras los primeros cinco días de cultivo, así como por el consumo de glucosa del medio de cultivo añadido al suelo; mientras que en el suelo inoculado con *Bj. adusta*, no se observó colonización, tampoco se detectó incremento de los sólidos volátiles ni consumo de glucosa. Por lo tanto se concluye que el hongo no se pudo desarrollar en el suelo. En ninguno de los casos se detectó actividad de las enzimas ligninolíticas, lo que contrasta con lo observado en los materiales lignocelulósicos.

Novotny y colaboradores encontraron resultados similares a los que aquí se describen, empleando diferentes hongos de la podredumbre blanca de la madera. Con *P. ostreatus* y *T. versicolor* la producción de enzimas ligninolíticas en matriz suelo es hasta 20 veces menor que la encontrada cuando se cultivan en paja de trigo, mientras que en el caso de *P. chrysosporium* la producción en suelo es aún mucho más baja (13). Estos mismos investigadores afirman que durante el crecimiento de hongos de

podredumbre blanca en el suelo, no sólo se reduce la actividad de las enzimas ligninolíticas, sino que se inhibe su síntesis. Por ejemplo, *I. lacteus*, que en medio líquido produce las enzimas LiP, MnP y Lac, en suelo sintetiza LiP y Lac, pero no MnP (24). Este fenómeno puede ser atribuido a la presencia de posibles sustancias inhibitorias. Los autores han evaluado el efecto de la presencia de Zn, Pb y Al que son algunos de los metales de mayor concentración presentes en el suelo, pero no se observó inhibición. Un factor adicional, que puede reducir los valores detectados de actividad enzimática en el suelo, es la capacidad de extracción. Algunos investigadores han encontrado que solamente un pequeño porcentaje de la actividad de una enzima presente en el suelo se observa en los extractos, mientras que la actividad restante queda fija en el suelo. La concentración del buffer de extracción y el tipo de suelo son factores importantes que limitan su recuperación (25). En conclusión, el hecho de que no se detectara actividad ligninolítica en el suelo, se puede deber a una pobre extracción, a la baja producción del hongo, o a la pérdida de actividad ocasionada por la presencia de algunos componentes del suelo.

Sobre suelos inoculados con hongos inmovilizados sobre carozo de maíz, se observó cualitativamente que tanto *P. chrysosporium* como *Bj. adusta* colonizaron abundantemente el suelo, aunque la mayor colonización siempre se observó con *P. chrysosporium*. En ambos cultivos se detectó la presencia de enzimas ligninolíticas, obteniéndose sus valores máximos entre los días 10 y 15 después de la inoculación del suelo (Ver tabla 1). Aunque en estos cultivos se detectó actividad ligninolítica, sus valores son bastante menores si se comparan con los obtenidos durante el crecimiento en este mismo soporte. En los cultivos de *P. chrysosporium* únicamente se detectó LiP en el suelo, lo que contrasta con el hecho de que sobre este material, el hongo sólo había producido MnP. En otros trabajos se han detectado tanto MnP como LiP en suelo con *P. chrysosporium* (26;27).

De otro lado, con *Bj. adusta* sólo se detectó producción de MnP sobre estos suelos inoculados de manera inmovilizada. ¿Esta también fue la principal enzima que se obtuvo en los soportes evaluados, aunque en este caso su producción fue 100 veces menor que en carozo de maíz. Otros autores también han detectado MnP de *Bj. adusta* en cultivos

en suelo (28;29). La producción de enzimas ligninolíticas en suelo también se ha estudiado con otros hongos ligninolíticos: *T. versicolor* (11;13), *I. lacteus* (24), *Pleurotus sp.* (30;31), *D. squalens* (30); no obstante, los valores son de difícil comparación dado que hay diferencias en los métodos usados para la extracción y la medición de las actividades ligninolíticas.

De lo anterior se puede concluir que los cultivos en suelo con *P. chrysosporium* y *Bj. adusta*, soportados en materiales lignocelulósicos, son adecuados para promover la colonización del suelo y la producción de enzimas ligninolíticas. Si se tiene en cuenta que la extracción de las enzimas del suelo es un fenómeno limitante, se puede decir que en los cultivos inoculados con soportes lignocelulósicos la producción de enzimas fue mayor que en suelo inoculado con hongo libre, dado que en el primer caso, el hongo dispone de mayor cantidad de sustrato para su crecimiento lo que facilita la síntesis de sus enzimas.

## CONCLUSIONES

*Bj. adusta* tiene mayor capacidad para producir enzimas ligninolíticas que *P. chrysosporium*, tanto en carozo de maíz como en viruta de madera, puesto que además de producir ambas enzimas, MnP y LiP, las produce en mayor concentración. MnP se detectó con una actividad cuatro veces mayor en *Bj. adusta*, respecto a *P. chrysosporium*. El carozo de maíz es el sustrato más fácilmente degradable de los tres evaluados, con cerca del 35% en 21 días de cultivo y es en el cual *Bj. adusta* produjo mayor cantidad de enzimas. Sin embargo, esta degradación no guarda relación proporcional con la actividad MnP, puesto que cultivos de *P. chrysosporium* con una menor concentración de MnP alcanzaron el mismo nivel de degradación del material. El compost de jardinería, por su parte, mostró ser un sustrato poco adecuado para la producción de enzimas dado que sus altos niveles de N y C inhiben la síntesis de MnP. En los cultivos de hongos libres sobre suelo no se detectó la presencia de enzimas ligninolíticas, posiblemente debido a la dificultad para su propagación y también para la extracción de las enzimas. En los cultivos sobre suelo inoculado con hongo inmovilizado con carozo de maíz, se detectó actividad ligninolítica aunque esta fue muy baja comparada con la alcanzada en las fermentaciones sobre los soportes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hammel KE. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New J Chem* 1996;20(2):195-198.
2. Barr DP, Aust SD. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol* 1994;28(2):78A-87A.
3. Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 1985;228(4706):1434-1436.
4. Radtke C, Cook WS, Anderson A. Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;41(2):274-280.
5. Childress AM, Bennett JV, Connick WJ, Daigle DJ. Formulation of filamentous fungi for bioremediation. *Biotechnol Tech* 1998;12(3):211-214.
6. Ryan TP, Bumpus JA. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in liquid culture and in soil by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989;31:302-307.
7. Bumpus JA. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental and Microbiology* 1989;55:154-158.
8. Lamar RT, Dietrich DM. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete spp.* *Appl Environ Microb* 1990;56:3093-3100.
9. Ullah MA, Kadhim H, Rastall RA, Evans CS. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;54(6):832-7.
10. Matheus DR, Ramos VL, Gomes KM. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World J Microb Biot* 2000;16(5):415-421.
11. Rama R, Sigoillot JC, Chaplain V, Asther M, Jolivalt C, Mouglin C. Inoculation of filamentous fungi in manufactured gas plant site soils and PAH transformation. *Journal of Polycyclic Aromatic Compounds* 2001;18(4):26-32.
12. Couto SR, Rivela I, Sanroman A. Design of different bioreactor configurations: application to ligninolytic enzyme production in semi-solid-state cultivation. *J Chem Technol Biot* 2001;76(1):78-82.
13. Novotny C, Erbanova P, Sasek V, Kubatova A, Cajthaml T, Lang E, et al. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation* 1999;10(3):159-68.
14. Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. En: Wood W, Kellogg ST, editores. *Methods Enzymology*. Vol. 161. London: Academic Press, 1988:238-249.
15. Field JA, de Jong E, Feijoo G, de Bont JAM. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl Environ Microb* 1992; 58(7):2219-2226.
16. Peric FH, Gold MH. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl Environ Microb* 1991;57(8):2240-2245.
17. Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Manganese peroxidase production by *Bjerkandera sp.* BOS55. 1. Regulation of enzymatic production. *Bioproc Biosyst Eng* 2000;23:657-661.
18. Feijoo G, Moreira MT, Sierra-Álvarez R, Field JA, Lema JM. Blanqueo de pasta Kraft con hongos ligninolíticos. *Afinidad* 1997;54(470):321-326.
19. Bumpus JA, Tudor F, Jurek M, Mileski GJ, Aust SD. Biological treatment of hazardous wastes by *Panerochaete chrysosporium*. *Biotechnology applications in hazardous waste treatment*. New York: Engineering Foundation, 1988:167-183.
20. Fujian X, Hongzhang C, Zuohu L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technol* 2001;80(2):149-151.
21. Castillo M, Andersson A, Ander P, Stenström J, Torstensson L. Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. *World J Microb Biot* 2001;17(6):627-633.
22. Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, et al. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of 14C-labelled lignin (14C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl Environ Microb* 1999; 65(5):1864-70.
23. Couto SR, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM. Evaluation of the environmental conditions for the continuous production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in fixed-bed bioreactors. *Biotechnol Lett* 2002;24(10):791-794.
24. Novotny C, Erbanova P, Cajthaml T, Rothschild N, Dosoretz C, Sasek V. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;54(6):850-3.
25. Vepsäläinen M. Poor enzyme recovery by extraction from soils. *Soil Biol Biochem* 2001;33(7-8):1131-1135.
26. Bogan BW, Schoenike B, Lamar R, Cullen D. Expression of lip genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microb* 1996;62(10):3697-3703.
27. Bogan BW, Schoenike B, Lamar R, Cullen D. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microb* 1996;62(7):2381-2386.
28. *Bioremediation Potential of white-ot fungi: Treatment of PAH-contaminated Soil*. Helsinki: 1998.
29. Novotny C, Svobodova K, Erbanova P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Sasek V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol Biochem* 2004;36(10):1545-1551.
30. Lang EK, Gonser A, Zadrzil F. Influence of incubation temperature on activity of ligninolytic enzymes in sterile soil by *Pleurotus sp.* and *Dichomitus squalens*. *J Basic Microb* 2000;40(1):33-39.
31. Baldrian P, Wiesche C, Jiri G, Nerud F, Zadrzil F. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl Environ Microb* 2000;66(6):2471-2478.